



**Instituto Politécnico de Tomar**

**Escola Superior de Tecnologia de Tomar**

**Cátia Marisa Moura Fernandes**

**Aplicação de Técnicas Analíticas para Detecção  
de Resíduos de Pesticidas por Cromatografia  
Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas**

**Relatório de Estágio**

**Orientado por:**

**Doutora Dina Mateus, IPT**

**Doutor Luís Grilo, IPT**

**Doutora Margarida Oliveira, VG**

Relatório de Estágio apresentado ao Instituto Politécnico de Tomar  
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção  
do grau de Mestre em Tecnologia Química







## Resumo

---

A cultura do olival está sujeita ao ataque de um grande número de doenças e pragas sendo os pesticidas o principal meio para a sua prevenção e controlo. Devido aos riscos inerentes à utilização de pesticidas com repercussões na saúde e na degradação do meio ambiente, há necessidade de uma monitorização dos níveis de resíduos de pesticidas. Nos últimos anos os avanços da Química Analítica em consonância com o conceito de sustentabilidade, levaram ao desenvolvimento de novos métodos alternativos de extração para determinação de resíduos de pesticidas.

O presente trabalho resulta do estágio desenvolvido no Laboratório Físico-Químico da Victor Guedes, em Abrantes, de 3 de Fevereiro a 31 de Julho de 2014. Este teve como principal objetivo a utilização de técnicas analíticas para a deteção/quantificação de resíduos de pesticidas utilizando o método de Quechers. Com o objetivo de atender aos rigorosos Limites Máximos de Resíduo estabelecidos por legislações internacionais, este método foi idealizado para gerar extratos que possam ser analisados por Cromatografia Gasosa acoplada á Espectrometria de Massa (GCMS). Os resíduos de pesticidas utilizados para este estudo são: buprofezina, cipermetrina, clortalonil, clorpirifos, deltametrina, dimetoato, endossulfão-sulfato, fentião, fosfamidação, fosmete, lambda-cialotrina, malatiação, metidatiação, oxifluorfena, paratiação-metil, tebuconazol, terbutilazina e triclorfão.

Concluiu-se que o estágio foi válido, pois permitiu-me adquirir competências de técnicas analíticas no controlo da qualidade e de gestão de um laboratório.

**Palavras-chave:** Resíduos de Pesticidas, Quechers, GCMS.



## Abstract

---

Olive cultivation is subject to attack by a large number of diseases and pests, being pesticides the main form for its prevention and control. Due to the risks inherent to the use of pesticides with repercussions on health and environmental degradation, there is a need for monitoring the levels of pesticide residues. In recent years, advances on analytical chemistry in line with the concept of sustainability, led to the development of new alternative extraction methods for the determination of pesticide residues.

This work results from the internship at the Physical-Chemical Laboratory of the company Victor Guedes, Abrantes, from the 3<sup>rd</sup> of February to the 31<sup>st</sup> of July 2014. Its main objective was the implementation of analytical techniques for the detection/quantification of pesticide residues using the QuEChERS method. Aiming to meet the strict maximum residue limits established by international law, this method was designed to generate extracts which can be analyzed by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GCMS). Pesticide residues used for this study are: buprofezin, cypermethrin, chlorothalonil, chlorpyrifos, deltamethrin, dimethoate, endosulfan sulphate, fenthion, phosphamidon, phosmet, lambda-cyhalothrin, malathion, methidathion, oxyfluorfen, parathion-methyl, tebuconazole, terbuthylazine and trichlorfon.

I would say that this internship was quite fruitful, because it allowed me to acquire competencies in analytical techniques in the field of quality control and management of a laboratory.

**Keywords:** Pesticide Residues, Quechers, GCMS.





## Agradecimentos

---

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Hermínia e Manuel, à minha tia São, às minhas irmãs, Ana e Zélia, e ao meu cunhado Paulo por acreditarem na minha capacidade, pelo incondicional apoio, carinho, atenção e incentivo que me deram durante todo este percurso. E aos meus queridos sobrinhos, Sofia, João e Joana, por tornarem os momentos difíceis mais animados. Agradeço a vocês a pessoa que sou e todas as coisas que já conquistei na minha vida.

À minha orientadora, Doutora Dina Mateus pela atenção, incentivo e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho. À Margarida Oliveira e Ana Silva da Victor Guedes pela oportunidade de trabalho no laboratório da empresa, pelo seu acolhimento e por toda a informação prestada. Gostava também de agradecer a todos os outros trabalhadores da empresa que de algum modo contribuíram para a realização deste estágio.

Aos meus caros colegas do Laboratório Físico-Químico da Victor Guedes: Sofia Felício e João Silva pela forma como me acolheram, pela disponibilidade e simpatia em transmitir todos os conhecimentos. Mas em especial à Filipa Trindade pelos momentos de descontração, pela sua sempre boa disposição e ajuda, tornando o ambiente de trabalho agradável apesar de todos os desafios e pelo tempo e paciência a mim dedicados.

Também quero agradecer aos Professores do IPT do Departamento de Química, em especial à Cecília Baptista, Valentim Nunes, Teresa Silveira, Natércia Santos, Paula Portugal e Henrique Pinho que contribuíram para a minha formação e fizeram com que acreditasse que poderia chegar sempre mais longe. Serei sempre grata por tudo!

Por fim quero agradecer a todos os meus amigos, mas em especial ao Pedro Isidoro e à Ana Marques por nunca desistirem de mim apesar de todos os obstáculos neste período, por toda a cumplicidade, motivação, apoio constante, paciência, compreensão, amizade e carinho que fizeram grande diferença ao longo deste percurso e por fazerem parte da minha vida. Um muito Obrigado a todos!



# Índice

<b>Capítulo 1- Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Enquadramento do tema.....	1
1.2. História da empresa Victor Guedes SA .....	1
<b>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>5</b>
2.1. A importância do azeite na saúde.....	5
2.2. Da Oliveira ao Azeite.....	5
2.3. Tipos de Azeite .....	7
2.4. Processo de Produção da Empresa .....	8
<b>Capítulo 3- Resíduos de pesticidas.....</b>	<b>11</b>
3.1. Definição, Riscos e Benefícios da Aplicação de Pesticidas.....	11
3.2. Classificação dos Pesticidas .....	12
<b>Capítulo 4- Estudos de Mercado .....</b>	<b>17</b>
4.1. Análise de Mercado ao Azeite .....	17
4.1.1. Produção no Mundo .....	17
4.1.2. Produção, Importação e Exportação em Portugal .....	19
4.2. Análise de Mercado aos Pesticidas .....	24
<b>Capítulo 5- Materiais e Métodos .....</b>	<b>27</b>
5.1. Materiais e reagentes.....	27
5.1.1. Limpeza dos materiais.....	27
5.2. Equipamentos e instrumentação.....	28
5.3. Padrão Interno e Resíduos de pesticida.....	28

5.4. Procedimento experimental.....	34
5.5. Métodos analíticos – GCMS .....	36
5.5.1. Condições Cromatográficas.....	40
5.5.2. Procedimentos de rotina do GCMS .....	41
5.6. Validação de métodos Analíticos.....	42
5.7. Método Multirresíduo de Extração - Quechers .....	47
<b>Capítulo 6- Resultados</b> .....	53
6.1. Análise de Pesticidas- Implementação de um método novo.....	53
6.1.1. Resultados Cromatográficos – Padrões individuais.....	53
6.1.2. Resultados Cromatográficos-MIX 1 de padrões.....	59
6.1.3. Relação entre a matriz e o Mix de padrões .....	60
6.1.4. Resultados Cromatográficos-Quechers com MIX 1 .....	61
6.2. Análise de pesticidas – Complemento do método utilizado na empresa .....	64
6.3. Análise de resíduos de pesticidas – Controlo de fornecedores .....	71
<b>Capítulo 7- Considerações Finais</b> .....	75
Referências Bibliográficas .....	77
Webgrafia .....	79

## Índice de Figuras

Figura 1- Título de Registo da Marca Gallo.....	2
Figura 2- Evolução dos logótipos e símbolos da marca Gallo. ....	4
Figura 3- A Oliveira .....	6
Figura 4- Classificação dos Azeites. ....	8
Figura 5- Fluxograma do processo de produção da empresa Vítor Guedes.....	9
Figura 6- Evolução da produção mundial de azeite desde 1998 até 2014 .....	17
Figura 7- Produção mundial de azeite nos países da orla mediterrânica .....	18
Figura 8- Principais consumidores mundiais de azeite referente á campanha de 2013/2014 .....	19
Figura 9- Evolução da produção nacional de azeite desde 2000 até 2014 .....	20
Figura 10- Evolução da produção nacional versus Consumo desde 2007 até 2013 .....	21
Figura 11- Distribuição regional de azeite extraído, em percentagem .....	22
Figura 12-Quantidade de azeite importado em Portugal durante as sucessivas campanhas ..	22
Figura 13- Quantidade de azeite exportado em Portugal durante as sucessivas campanhas .....	23
Figura 14- Venda de pesticidas por superfície agrícola (Kg/ha), em Portugal entre os anos 2007-2011.....	24
Figura 15- Repartição da venda de pesticidas segundo o tipo de função .....	25
Figura 16- Cromatograma de uma limpeza de um balão volumétrico. ....	28
Figura 17- Estrutura molecular do Antraceno. ....	29
Figura 18- Preparação do Mix 1 de concentração 10ppm. ....	35
Figura 19- Preparação das diluições do Mix 1. ....	35
Figura 20- Esquema básico de um cromatógrafo gasoso . ....	37
Figura 21- Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrómetro de massas modelo 5975C da Agilent Technologies. ....	39
Figura 22- Software GC-MSD Data Anlysis.....	40
Figura 23- Comparação da linha de base da rampa com a da mistura teste. ....	41

Figura 24- Comparação de duas misturas teste para testar a reprodutibilidade do aparelho. .....	41
Figura 25- Representação gráfica do ruído da linha de base, do LD e LQ. ....	43
Figura 26- Cromatograma da mistura teste na integra. ....	45
Figura 27- Overlay dos cromatogramas referentes às injeções dois e cinco, do tempo zero aos 22 minutos. ....	45
Figura 28- Overlay dos cromatogramas referentes às injeções dois e cinco, do tempo 25 aos 32 minutos. ....	45
Figura 29- Fluxograma representativo do Método Quechers.....	48
Figura 30- Passos analíticos para a realização do método de Quechers. ....	51
Figura 31- Cromatograma da matriz isenta de padrões, em SIM.....	52
Figura 32- Cromatograma do Fentião mostrando o seu tempo de retenção e o espectro de massas. ....	53
Figura 33- Biblioteca NIST do padrão Fentião. ....	54
Figura 34- Cromatograma do padrão Clortalonil em SCAN. ....	56
Figura 35- Cromatograma do Fentião mostrando os iões maioritários selecionados. ....	56
Figura 36- Cromatograma da Oxifluorfena em SCAN. ....	58
Figura 37- Cromatograma da Oxifluorfena em SIM.....	59
Figura 38- Cromatograma do Mix 1 com uma concentração de 10ppm, em SCAN. ....	60
Figura 39- Cromatograma do Mix 1 com uma concentração de 10ppm, em SIM.....	60
Figura 40- Overlay do cromatograma do Mix 1 (10ppm) com a matriz isenta de padrões, em SIM.....	61
Figura 41- Overlay dos cromatogramas do Mix 1 de 10ppm com o Quechers. ....	62
Figura 42- Reta de calibração do dimetoato.....	63
Figura 43- Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 1 ppm em SCAN e SIM. ...	65
Figura 44- Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 500ppb e 200ppb, em SIM. .....	66
Figura 45- Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 100 ppb e 50ppb, em SIM.	66
Figura 46- Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 20ppb e 10ppb, em SIM. ..	66
Figura 47- Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com os padrões já implementados. .....	67

Figura 48- Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com o Quechers isento de padrões, em SIM. ....	67
Figura 49- Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com o Quechers, em SIM. ....	68
Figura 50- Representação cromatográfica da integração da Terbutilazina (1ppm) e do padrão interno.....	69
Figura 51- Reta de calibração obtida para a terbutilazina. ....	70
Figura 52- Método implementado na empresa. ....	71
Figura 53- Reta de calibração para a Oxifluorfena.....	72
Figura 54- Principais incidências de pesticidas na VG. ....	73





## Índice de Tabelas

Tabela 1-Classificação de pesticidas por alvo de ação .....	13
Tabela 2- Classificação dos pesticidas quanto ao grau de toxicidade .....	16
Tabela 3- Características dos pesticidas selecionados para este estudo. ....	30
Tabela 4- Propriedades físico-químicas dos padrões selecionados para o estudo.....	32
Tabela 5- Padrões com os respetivos tempos de retenção e iões característicos.....	55
Tabela 6- Limites de deteção e quantificação para os padrões estudados, em ppb, nos modos SCAN (*) e SIM (**). ....	57
Tabela 7- Cálculo da área relativa. ....	62
Tabela 8- Cálculo da concentração relativa e respetivo fator de recuperação. ....	63
Tabela 9- Retas de calibração dos restantes padrões do mix1 e o fator de recuperação obtido.....	64
Tabela 10- Padrões de pesticidas com os respetivos tempos de retenção e iões característicos. ....	65
Tabela 11- Áreas obtidas na integração dos cromatogramas adquiridos na extração do Quechers.....	69
Tabela 12- Cálculo da Concentração relativa e da recuperação para as diversas concentrações. ....	70
Tabela 13- Cálculo da área relativa. ....	72



# **CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO**

## **1.1. Enquadramento do tema**

O presente relatório é referente ao estágio realizado no laboratório físico-químico e na sala de cromatografia da Empresa Victor Guedes, S.A. no âmbito do trabalho final de Mestrado em Tecnologia Química com a duração de seis meses. O estágio teve como principal objetivo a aplicação de técnicas analíticas para detetar resíduos de pesticidas por Cromatografia Gasosa acoplada á espetrometria de massas. Assim, este relatório divide-se em sete capítulos, com principal ênfase para os capítulos 3 e 5 referentes aos resíduos de pesticidas e os métodos de análise usados.

O capítulo 1 é referente à história da empresa Victor Guedes, seguidamente, o capítulo 2 é relativo a uma revisão bibliográfica com referências que vão desde a oliveira até á qualidade do azeite. O capítulo 3 é dedicado aos resíduos de pesticidas explicando o porquê da sua utilização, o impacto que têm no ambiente e na saúde humana, e outras informações relevantes para este estudo. No capítulo 4 é feita uma breve análise de mercado aos azeites e aos pesticidas, em Portugal e no Mundo. No capítulo 5 descreve-se o desenvolvimento experimental do trabalho que consistiu na aplicação de métodos analíticos para determinar resíduos de pesticidas em amostras de azeite, e a descrição dos métodos de análise aplicados, desde o método de preparação da amostra pelo Método de Quechers até á análise de resíduos de pesticidas por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espetrómetro de Massas. No capítulo 6 apresentam-se aos resultados obtidos durante a realização do estágio e por último, o capítulo 7 é referente às considerações e conclusões finais do trabalho efetuado.

## **1.2. História da empresa Victor Guedes SA**

A empresa Victor Guedes, com quase um século de história, está situada no Rossio ao Sul do Tejo, concelho de Abrantes e é onde se produz o tão famoso Azeite GALLO. A origem do Azeite Gallo remonta aos finais do século XIX, em 1860, data em que se fundou em Abrantes um estabelecimento composto por fábrica e armazéns pertencente à "União Industrial, Lda.". Aqui, a marca, dedicava-se à exportação de produtos portugueses como

azeites, azeitonas em conserva, vinhos, castanhas, frutos secos, entre outros, para mercados com elevada emigração Portuguesa como o Brasil e a Venezuela. Foi deste modo que, em 1919, foi registada a marca Gallo (Figura 1) por um visionário chamado Victor Guedes.



**Figura 1-** Título de Registo da Marca Gallo (Gallo, 2014).

Conta a lenda que o Senhor Victor Guedes terá decidido dar o nome GALLO ao azeite, porque numa manhã, depois de acordar abriu as janelas do seu quarto e ouviu um galo a cantar. Porque era de origem Galega, registou o nome da marca com dois "L", nome que até hoje foi preservado pela sua graça e originalidade.

Então, em 1938, a empresa Victor Guedes SA adquiriu as instalações da União Industrial Lda. Desde então, a Gallo tem vindo a cantar cada vez mais alto. A "Victor Guedes & C<sup>a</sup>" começou, então, a preparar em Abrantes os lotes de azeite que seriam transportados a granel para um armazém no Poço do Bispo, em Lisboa, onde eram embalados em latas para exportação para mercados ultramarinos.

Já em 1967 as máquinas de embalar azeite são transferidas para Abrantes onde, a partir de então, se passa a fabricar o produto pronto para ser embarcado. Até esta altura o mercado doméstico era considerado como um negócio secundário onde só era vendido "Azeite Extra Virgem". Os mercados ultramarinos eram o alvo principal da atividade e a empresa mantinha aí a sua presença com duas marcas de azeite: "GALLO" e "BORBOLETA", sendo esta última uma marca de segunda linha.

Inicialmente a empresa estava centrada na produção de azeite para exportação e em 1969, ocorreu uma mudança de estratégia fulcral ao definir como principal objetivo a penetração no mercado doméstico de azeite, de óleo embalado, de sabão tradicional e de azeitonas em conserva. Seguiu-se uma fase de forte expansão industrial, com importantes investimentos na abertura de novas instalações e na modernização das instalações existentes.

Em 1989, o grupo Unilever - Jerónimo Martins, adquire a marca Gallo e a partir deste momento, acentuou-se o processo de modernização e crescimento da companhia através do investimento em infraestruturas, do relançamento da marca em 1991 com o Azeite Novo, com notas extremadas de amargos e picantes, e da criação dos Azeites com Ervas Aromáticas em 1999. Ao virar do século, GALLO era já a referência nacional no mercado do azeite e um ícone da portugalidade; do seu sabor, da sua tradição e da sua qualidade.

Em 2009, procede-se á separação das unidades de negócio da Unilever- Jerónimo Martins, criando-se a empresa Gallo Worldwide (GWW). Com uma estrutura própria a GWW passa a deter a 100% a Victor Guedes SA.

Nesta primeira década do século XXI, o azeite GALLO tem consolidado a sua posição como líder nacional, inovando progressivamente a sua imagem (Figura 2). Estas renovações têm tornado a marca cada vez mais atual, atrativa e próxima dos consumidores, sempre sem perder a sua identidade e principal símbolo – o galo. Esta mentalidade de inovação e ambição reflete-se também na constante renovação e melhoria da sua gama de produtos com o lançamento de azeites especiais e exclusivos, e criando novos produtos como pasta de azeitonas, vinagres e piripiri.



**Figura 2-** Evolução dos logótipos e símbolos da marca Gallo.

Atualmente, o Azeite GALLO é a 3ª marca mundial de azeite, é comercializado nos 5 continentes e em mais de 47 países, sendo líder de mercado em Portugal, Brasil, China e Angola. A GALLO é hoje a marca portuguesa nº 1, produzindo cerca de 30 mil toneladas de azeite por ano, dos quais 70% são para exportação e conquistou em 2013 oito prémios a nível Europeu (Gallo, 2014).

## Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

### 2.1. A importância do azeite na saúde

Ao longo dos anos tem-se vindo a efetuar vários estudos relativos ao uso do azeite na dieta mediterrânea e tem-se verificado que este é de extrema importância na alimentação, uma vez que assume um papel importante na saúde devido às suas características químicas, e às suas propriedades terapêuticas. Como suporta temperaturas muito elevadas (até 210°-220°C) sem degradação dos seus componentes, pode ser usado em todas as formas de confeção culinária sem ocorrer formação de substâncias nocivas à saúde como acontece com outras gorduras (Santos, 2011). Logo, os principais benefícios do azeite são:

- ❖ Ajuda a reduzir a taxa de colesterol total e aumenta as lipoproteínas de alta densidade ou “ bom colesterol” (HDL) fazendo diminuir o risco de enfarte;
- ❖ Favorece a mineralização óssea, estimula o crescimento e a absorção de cálcio;
- ❖ Protege o sistema digestivo e regula o trânsito intestinal;
- ❖ Previne os efeitos nocivos da idade sobre as funções cerebrais e o envelhecimento dos tecidos e órgãos em geral;
- ❖ Inclui uma quantidade considerável de vitaminas, com especial ênfase nas vitaminas E e K;
- ❖ Ajuda a prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e devido às suas propriedades antioxidantes ajudar a prevenir vários tipos de cancro;
- ❖ Diminui a agregação das plaquetas sanguíneas, reduzindo o risco de trombose (Gallo, 2014).

### 2.2. Da Oliveira ao Azeite

A oliveira (Figura 3), *Olea europaea L.*, é a árvore mais antiga cultivada pelo homem e produz um fruto comestível, a azeitona. A *Olea europaea L.* encontra-se distribuída pelas regiões tropicais e temperadas de todo o Mundo. A primeira citação histórica do cultivo da oliveira refere-se ao norte da Síria, de onde mais tarde se terá expandido para o Egipto e a toda a bacia Mediterrânica. A nível morfológico são árvores de porte médio com folhagem

persistente, crescimento lento, com uma copa redonda, bastante densa e de grande longevidade que tolera amplas condições de temperatura e de solos (Lopes, 2011).



**Figura 3-** A Oliveira (Infoescola, 2014).

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação), a área mundial de olival é cerca de 7,5 milhões de hectares e os principais produtores são a Espanha, Itália, Grécia, Tunísia, Turquia, Síria, Marrocos e Portugal. Em média, uma oliveira dá 30 Kg de azeitonas, sendo necessários cerca de 5 a 6 Kg para produzir 1 L de Azeite. Segundo a ADEMO (Associação para o Desenvolvimento dos Municípios Olivícolas Portugueses), o Azeite é uma gordura extraída exclusivamente por processos mecânicos da azeitona sob condições térmicas controladas. A produção do azeite envolve uma série de etapas que vão desde a apanha das azeitonas até ao armazenamento do azeite, passando por uma série de transformações que permitem a sua obtenção e asseguram a sua qualidade (ADEMO, 2014).

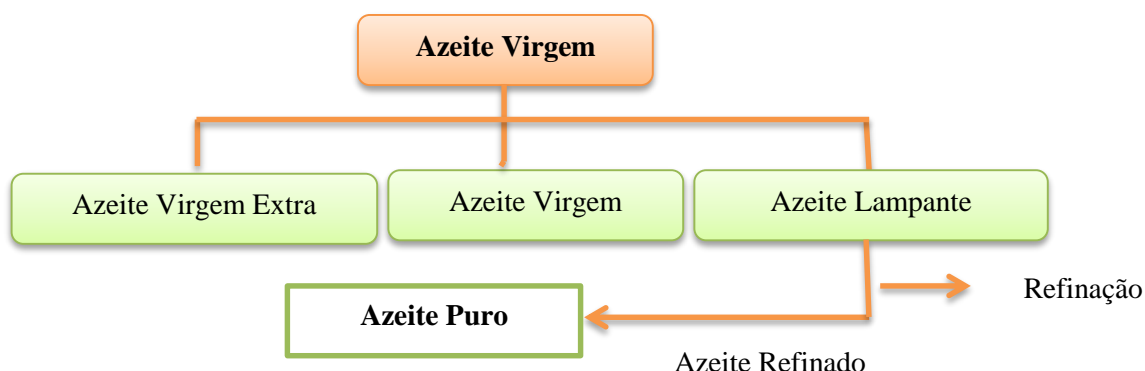
O azeite é um alimento rico em ácidos gordos monoinsaturados com 9 Kcal/g e é basicamente uma mistura de triacilgliceróis, com alguns ácidos gordos livres, mono e diacilgliceróis e alguns constituintes não saponificáveis, como ceras, álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, fosfolípidos, compostos fenólicos, fitosteróis, tocoferóis, carotenóides e clorofilas. A presença destas substâncias reveste-se de elevada importância, tanto do ponto de vista nutricional como da estabilidade e da qualidade organolética do produto (Cunha, 2007).



## 2.3. Tipos de Azeite

Segundo o Codex Alimentarium e o COI (Internacional Olive Council), o azeite pode ser classificado em diversas categorias:

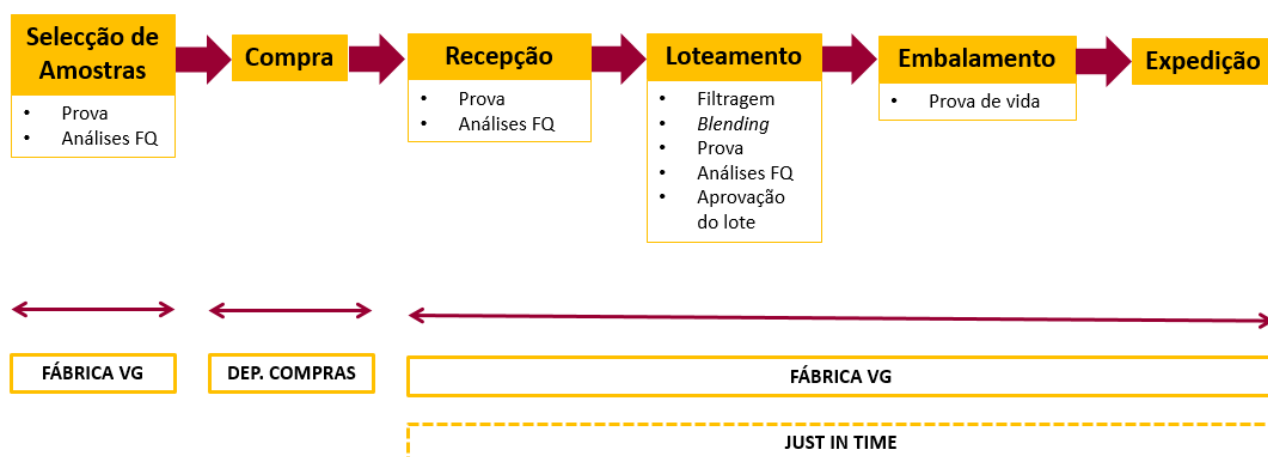
- ❖ **Azeites Virgens:** são obtidos do fruto da oliveira somente por processos mecânicos em condições térmicas que não alteram o óleo (Figura 4). Com base nos critérios de qualidade, distinguem-se vários tipos de azeite virgem:
  - **Azeite extra virgem:** é um azeite virgem com acidez, expressa em ácido oleico, inferior a 0,8%. Com um sabor e aroma absolutamente perfeitos, este azeite é considerado o de mais alta qualidade entre todos os tipos de azeite e pode ser vendido diretamente ao consumidor.
  - **Azeite virgem:** é um azeite com acidez, expressa em ácido oleico, compreendido entre 0,8 e 2% e o que o difere do extra virgem é a sua organolética. Apesar de ter uma qualidade inferior ao do extra virgem este tipo de azeite também pode ser vendido diretamente ao consumidor.
  - **Azeite lampante:** é um azeite virgem com baixa qualidade, com acidez, expressa em ácido oleico, superior a 2%. Este tipo de azeite é impróprio para consumo e tem de ser refinado, para que se lhe retirem os defeitos como a acidez elevada, sabores e odores estranhos.
- ❖ **Azeite refinado:** azeite obtido a partir de azeite virgem lampante por métodos de refinação. A sua acidez, expressa em ácido oleico, não pode exceder 0,3%. A refinação é feita geralmente em três fases (neutralização, branqueamento e desodorização), cada uma delas com o objetivo de eliminar uma característica indesejável do azeite.
- ❖ **Azeite Puro:** consiste na mistura de azeite virgem, apto para consumo humano, com azeite refinado. A sua acidez livre, expressa em ácido oleico, não pode exceder 1% (Pedrosa, 2010).



**Figura 4-** Classificação dos Azeites.

## 2.4. Processo de Produção da Empresa

Gallo tem dezenas de produtores parceiros e anualmente recebe mais de 5000 amostras, das quais 70% são rejeitadas por não terem o padrão de qualidade Gallo. Após esta primeira seleção, onde se fazem análises organoléticas, o departamento de compras adquire a matéria-prima. O azeite é transportado em camiões-cisterna (cerca de 25 toneladas), as quais garantem o cumprimento dos requisitos legais no que respeita à higiene e segurança alimentar. Antes da descarga é feita uma inspeção visual da cisterna para que se possa fazer a descarrega. Durante esta etapa são recolhidas amostras em contínuo diretamente da cisterna que são analisadas pelo laboratório físico-químico que posteriormente assegura se a matéria-prima está ou não em conformidade face aos requisitos especificados. A matéria-prima é armazenada em depósitos de receção devidamente identificados e dedicados a cada tipo de azeite na Adega de Azeite e Loteamento (AAL). De seguida o azeite é filtrado passando por uma zona de desbaste e outra de polimento. O desbaste tem como objetivo a separação do azeite das águas russas e o polimento é feito em filtros de placa que tem como objetivo retirar humidade ao produto. Após a filtração, o azeite é transferido para depósitos de maior capacidade onde é feito o Loteamento, que é a combinação dos azeites escolhidos, de modo a criar diferentes perfis de sabores (*blending*). Quando feitos os lotes e após aprovação dos mesmos pelo departamento de Qualidade, estes são enviados para os depósitos de embalagem. O azeite é finalmente embalado e enviado para armazém onde aguarda expedição (Figura 5).



**Figura 5-** Fluxograma do processo de produção da empresa Vítor Guedes.



## Capítulo 3- Resíduos de pesticidas

A utilização de pesticidas, que por um lado visa gerar benefícios, por outro lado, é responsável pela contaminação do solo, da água e alimentos, representando uma grande ameaça ao meio ambiente e à saúde humana. Portanto, a determinação de resíduos de pesticidas desempenha um papel importante para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a estes compostos, possibilitando decisões regulatórias e comerciais visando garantir a segurança alimentar (Prestes *et al.*, 2009). Neste capítulo explica-se o porquê da utilização de pesticidas, o impacto que eles têm sobre o ambiente e na saúde humana, a sua classificação, e outra informação relevante.

### 3.1. Definição, Riscos e Benefícios da Aplicação de Pesticidas

Segundo a definição internacionalmente aceite pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a OMS (Organização Mundial de Saúde), um pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias utilizada na prevenção, controlo ou destruição de pragas (incluindo vetores de doenças), que interfiram com a produção, armazenamento, transporte, distribuição e transformação de géneros alimentícios e produtos agrícolas. São frequentemente adotadas outras designações como por exemplo agrotóxico, defensivo agrícola, praguicida, desinfetante, agroquímico ou produto fitofarmacêutico (Barbosa, 2012).

Os pesticidas desempenham um papel importante na produção de alimentos, porque asseguram a boa sanidade das culturas agrícolas e protegem as colheitas, pois todos os anos, cerca de 30 a 48% da produção mundial de alimentos é destruída ou consumida por pragas. As principais vantagens do uso de pesticidas são o aumento de produções, o aumento do tempo de vida dos produtos agrícolas, representando vantagens económicas para os produtores e aumentando a oferta e mesmo a variedade de produtos agrícolas para o consumidor. No entanto, a utilização abusiva e não controlada dos pesticidas representa um risco para a saúde do homem e para o ambiente considerando que são compostos a que está sempre inerente um certo grau de toxicidade, devido à sua alta resistência bioacumulam-se na cadeia alimentar, atuando sobre sistemas biológicos vitais como se verifica a nível do

sistema nervoso, da inibição da acetilcolinesterase ou da respiração e na inibição do transporte de eletrões nas mitocôndrias (Araújo, 2011).

Segundo a OMS o valor total anual é de 500 mil intoxicações, em 1975, e de três milhões em 1990, sendo neste caso de 220 mil o número de mortes, sendo que 70% ocorrem em países de Terceiro Mundo, e admitindo-se a existência de muitos outros casos.

Portanto, tem havido um esforço em minimizar a utilização de pesticidas com o uso de novos meios de luta (culturais, biológicos, genéticos e biotecnológicos) para controlar pragas e doenças. Contudo, o uso de pesticidas continua a ser o meio de controlo mais comum. Por isso, só nos últimos anos com os avanços científicos (desenvolvimento de novas técnicas tanto de extração como de análise), e uma política responsável (leis mais específicas e o monitoramento de agências regulamentadoras como a DGAV (Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária)), é que se tem feito uma nova avaliação da qualidade dos alimentos consumidos em relação à presença de pesticidas (Silva, 2010; Barbosa, 2012).

### 3.2. Classificação dos Pesticidas

Devido à grande diversidade de princípios ativos e formulações possíveis, com diferentes graus de toxicidade e organismos alvos é importante existir um sistema de classificação dos pesticidas. O sistema de classificação mais comum é segundo o seu modo de ação, duração do efeito residual, a sua estrutura química, alvos de ação, segundo a sua classe química, e por fim, a sua classificação toxicológica.

Quanto ao **modo de ação** os pesticidas podem ser sistémicos ou não sistémicos. Os não sistémicos têm ação de contato (via dérmica), penetração, ingestão (via oral) e fumegante (via respiratória). Os pesticidas sistémicos surgiram como um aperfeiçoamento na seletividade do combate à praga, com a intenção de não matar os insetos não nocivos. É transportado pela seiva do vegetal em quantidade letal para o inseto, sem prejudicar a planta (Silva, 2010).

Outra forma de classificação dos pesticidas é quanto à **estrutura química**, sendo que os pesticidas são classificados como compostos inorgânicos e orgânicos. Os compostos inorgânicos são constituídos por arsénio, bário, cádmio, chumbo, cobre, ferro, fósforo,

mercúrio, nitrogénio, selénio, tálio e zinco, entre outros. Já os orgânicos constituem o grupo de maior importância e são assim chamados devido à presença do átomo de carbono na sua fórmula. São divididos em sintéticos (compostos produzidos pelo homem) e naturais (Oliveira, 2006).

Quanto aos **alvos de ação**, os pesticidas podem ser classificados de acordo com o organismo que combatem (Tabela 1). Esta classificação pode ser associada a outros critérios e fornecer assim classificações mais informativas.

**Tabela 1**-Classificação de pesticidas por alvo de ação (Vilarinho, 2011).

<b>Designação</b>	<b>Organismo Alvo</b>
<b>Fungicidas</b>	Fungos
<b>Inseticidas</b>	Insetos
<b>Avicidas</b>	Pássaros
<b>Acaricidas</b>	Ácaros, Aranhas
<b>Formicidas</b>	Formigas
<b>Piscicidas</b>	Peixes
<b>Herbicidas</b>	Ervas Infestantes
<b>Nematicidas</b>	Vermes
<b>Rodencidas</b>	Roedores
<b>Moluscidas</b>	Lesmas e caracóis
<b>Algicidas</b>	Algas
<b>Bactéricidas</b>	Bactérias

Quanto à **classe química**, os pesticidas podem agrupar-se em classes de substâncias cujo princípio ativo é formado por estruturas moleculares semelhantes. Uma vez que os inseticidas, os herbicidas e os fungicidas constituem os grupos de pesticidas cuja utilização é mais expressiva serão de seguida descritos alguns dos subgrupos em que cada um destes grupos se pode subdividir.

## Inseticidas

No que concerne aos inseticidas, a classificação por classe química subdivide-os em quatro classes principais: os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos e os piretróides.

Os inseticidas **organoclorados** são pesticidas orgânicos, de síntese e que contêm átomos de carbono e cloro na sua estrutura tal como o nome sugere. Estes compostos foram os primeiros a ser sintetizados e podem, por sua vez, ser subdivididos em três grupos distintos: os diclorodifeniletanos, os ciclodienos, e os ciclohexanos clorinados. Estes pesticidas apresentam como características principais a baixa volatilidade, elevada estabilidade química, elevada lipossolubilidade, lentas taxas de degradação e de biotransformação o que faz com que sejam extremamente persistentes a nível ambiental e bioconcentrados ao longo da cadeia alimentar. Estes compostos alteram a normal transmissão dos impulsos nervosos e emitem impulsos espontaneamente, provocando a torção dos músculos, convulsões e eventualmente a morte. Além disto provocam falhas ao nível do sistema reprodutor e podem ser um fator de risco no início da gravidez causando malformações no feto.

Nos inseticidas **organofosforados** incluem-se os pesticidas que contêm átomos de fósforo. São pesticidas não persistentes em oposição aos organoclorados, representando do ponto de vista ambiental uma evolução e não se acumulam nos tecidos gordurosos. Estudos realizados nos últimos anos têm provado que estes pesticidas podem ser mutagénicos, cancerígenos, citotóxicos, genotóxicos, teratogénicos e imunotóxicos. Quimicamente são ésteres do ácido fosfórico ou do ácido fosforotióico. Estes compostos inibem o normal funcionamento do sistema nervoso, provocando paralisia e mesmo a morte.

Os **carbamatos** são derivados do ácido carbâmico ( $\text{H}_2\text{NCOOH}$ ) e constituem o grupo mais versátil de pesticidas, podendo encontrar-se compostos deste tipo que funcionam como inseticidas, herbicidas, fungicidas e até antibacterianos. São menos tóxicos que os fosforados e mais tóxicos que os clorados, degradam-se relativamente rápido e não se acumulam em tecidos gordurosos.

A classe dos **piretróides** tem a sua origem na mimetização sintética da estrutura de inseticidas naturais extraídos das flores do crisântemo. Os piretróides são muito pouco



persistentes no ambiente, muito tóxicos para os insetos mas são menos tóxicos para os mamíferos do que os inseticidas organofosforados ou do que os carbamatos.

## **Herbicidas**

Estima-se que as ervas possam ser responsáveis por quebras na produção agrícola da ordem dos 9 a 10%. Este facto associado ao crescimento da mecanização da agricultura, em parte devida aos aumentos do custo do trabalho, contribui para o desenvolvimento de numerosos compostos químicos capazes de controlar o crescimento das ervas nos campos agrícolas e para a crescente utilização deste tipo de pesticidas. Das várias classes de herbicidas podem destacar-se os clorofenoxiacéticos, os bipirifos, as triazinas, as cloroacetoanilinas ou os fosfonometil aminoácidos.

## **Fungicidas**





A classe dos fungicidas é, igualmente, composta por mais um grupo heterogéneo de compostos químicos que incluem compostos inorgânicos como o enxofre ou o sulfato de cobre, compostos aril- e alquil-mercuriais, ditiocarbamatos, fentalamidas e fenóis clorinados. Os fungicidas são muitas vezes aplicados na fase pós colheita, uma vez que as infeções por fungos nesta fase podem ser responsáveis por perdas significativas da produção de vegetais.

Em termos bioquímicos os fungicidas podem exercer a sua ação por serem inibidores da respiração, inibidores da síntese proteica, inibidores da mitose ou ainda inibidores da biossíntese de esteróis, que são importantes constituintes da parede celular dos fungos. Os fungicidas podem ser classificados como protetores, curativos ou de erradicação. Os fungicidas protetores são aplicados nas plantas antes destas serem infetadas pelos fungos, como forma de prevenir a penetração do patogéneo no vegetal. Os fungicidas curativos utilizam-se logo após o início da infeção da planta, uma vez que apresentam potencial para parar ou retardar o crescimento do micélio na superfície dos vegetais. Os fungicidas de erradicação controlam o desenvolvimento de fungos na sequência do aparecimento de

sintomas, geralmente após esporulação, eliminando tanto os esporos como o micélio e penetrando a cutícula da planta ao nível subdérmico (Araújo, 2011; Barbosa, 2012).

Por último, em relação à **toxicidade**, a OMS utiliza desde 1975 a classificação apresentada na Tabela 2. A classificação obedece ao resultado de testes ou estudos realizados em laboratório, baseando-se na toxicidade para o rato, nomeadamente na determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>) do pesticida, que considera a quantidade da substância tóxica produzindo uma mortalidade de 50%, em condições controladas e num período de 24 horas.

**Tabela 2-** Classificação dos pesticidas quanto ao grau de toxicidade (Oliveira, 2011).

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL <sub>50</sub> (mg/Kg)		Faixa Colorida
		Via Oral	Via Dérmica	
<b>I</b>	Extremamente Tóxico	<5	<50	
<b>II</b>	Altamente Tóxico	5-50	50-200	
<b>III</b>	Mediante Tóxico	50-200	200-2000	
<b>IV</b>	Pouco Tóxico	>2000	>2000	
<b>V</b>	Muito Pouco Tóxico	>5000		-

Além destas classificações existem também classificações toxicológicas para efeitos específicos na saúde que incluem efeitos a longo prazo. Assim os pesticidas podem ser classificados de acordo com os conhecimentos disponíveis, em muitos tóxicos (T+), tóxicos (T), corrosivos (C), irritantes (Xi) e nocivos (Xn) de acordo com os efeitos específicos na saúde como, por exemplo, a sua carcinogenicidade, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva, possibilidade de causar lesões oculares ou pulmonares (Araújo, 2011).

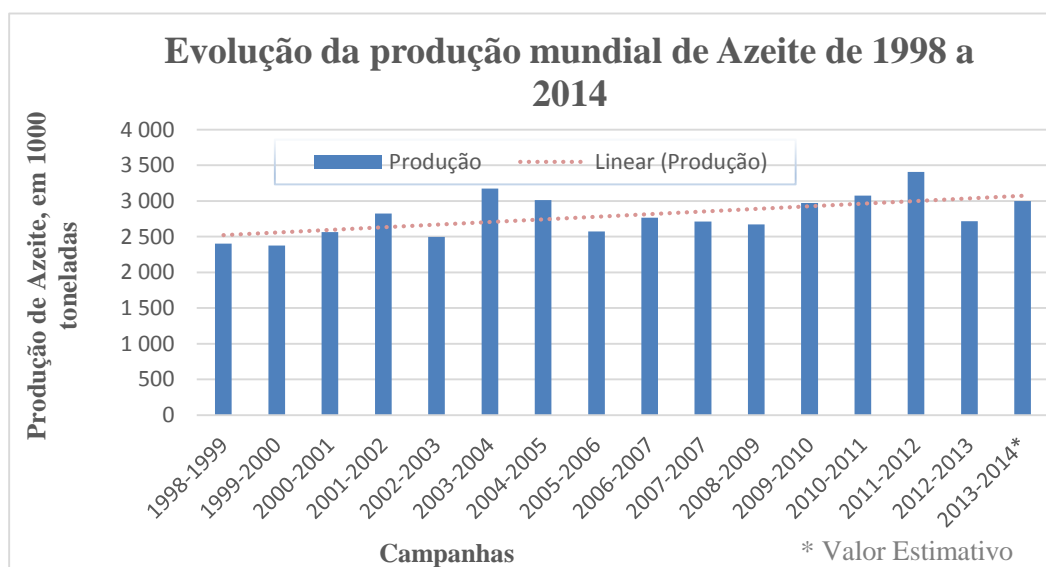
## Capítulo 4- Estudos de Mercado

### 4.1. Análise de Mercado ao Azeite

#### 4.1.1. Produção no Mundo

Segundo os valores obtidos nas campanhas de 2000-2001 a 2013-2014, a produção mundial média de azeite rondou os 2,8 milhões de toneladas por ano, demonstrando um aumento, relativamente aos anos 90, dado que a média das campanhas de 1990-1991 a 1999-2000 foi de 2,09 milhões de toneladas por ano (Figura 6).

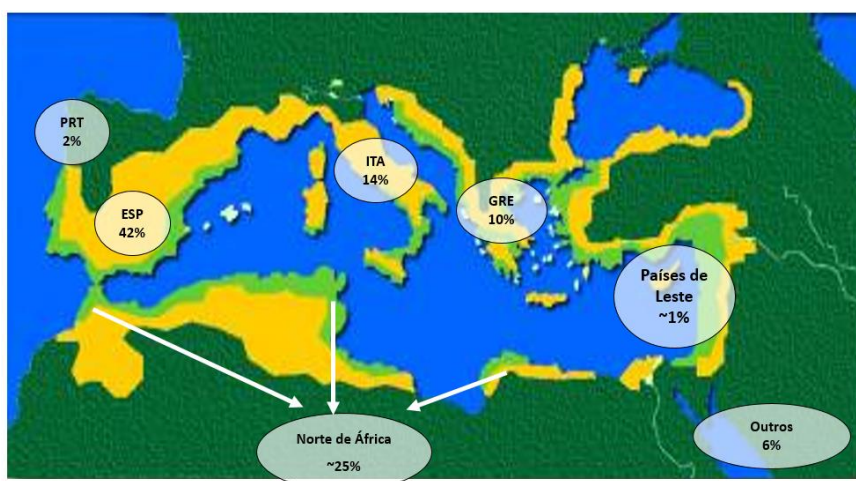
A produção oleícola é caracterizada por um fenómeno de alternância de produções, isto é, normalmente a seguir a um ano de baixa produção, segue-se um ano com um aumento significativo de produção. No entanto, essas alternâncias, que podem ocorrer nalgumas produções, não se traduzem do mesmo modo em todos os países oleícolas, o que permite evitar a existência de grandes flutuações do balanço global de produção de azeite (Aires, 2007).



**Figura 6-** Evolução da produção mundial de azeite desde 1998 até 2014 (dados de Casa do Azeite, 2014).

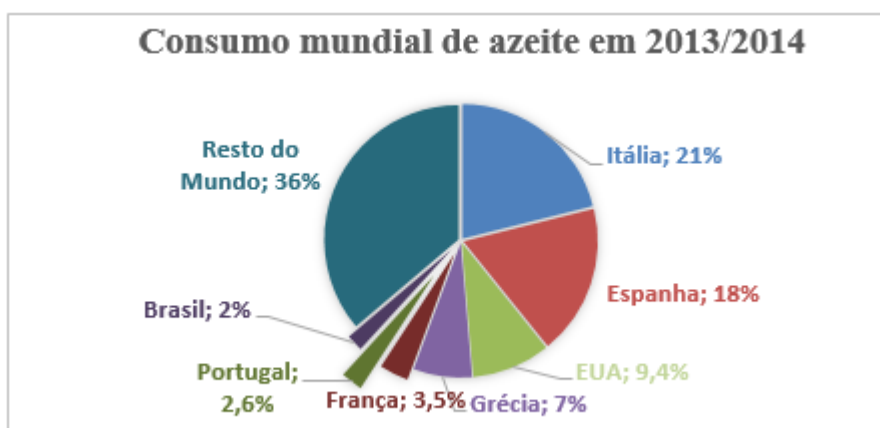
Em relação à campanha de 2013/2014, a produção estimada ronda os três milhões de toneladas, o que seria um aumento de 20 por cento em comparação à campanha precedente (2,7 milhões de toneladas). No entanto, trata-se de uma primeira aproximação que se poderá definir melhor após os dados apresentados pelo COI, no final deste ano. Analisando a produção mundial referente às últimas 15 campanhas, pode verificar-se uma taxa média de crescimento de 0,9% ao longo deste período.

A produção de azeite está principalmente concentrada nos países da orla mediterrânica, sendo estes responsáveis por 90 a 95% da produção total mundial, como se pode verificar pela Figura 7. A oleicultura, além de ser um elemento fundamental nos hábitos dietéticos e culturais dessa região, possui um papel importante em relação ao meio-ambiente, pois contribui para diminuição da desertificação (Casa do Azeite, 2014).



**Figura 7-** Produção mundial de azeite nos países da orla mediterrânica (COI, 2014).

Relativamente ao consumo de azeite a nível mundial, a Figura 8 mostra o consumo dos principais países associados à campanha de 2013/2014.



**Figura 8-** Principais consumidores mundiais de azeite referente á campanha de 2013/2014 (dados de COI, 2014).

Portugal a par do Brasil e França são os Estados Membros em que os acréscimos de consumo têm sido mais acentuados, sendo Itália, Espanha, Grécia e os EUA os maiores consumidores em termos absolutos.

O índice de consumo de azeite *per capita* em Portugal nesta última campanha foi de 7,4 kg/habitante.ano, o que esteve bastante aquém dos registados nos outros Estados Membros, como a Grécia (19 kg/habitante.ano), Espanha (13,4 kg/habitante.ano) e Itália (10,2 kg/habitante.ano), estando ainda distanciado dos atingidos na década de 60 (10,5 kg/habitante.ano).

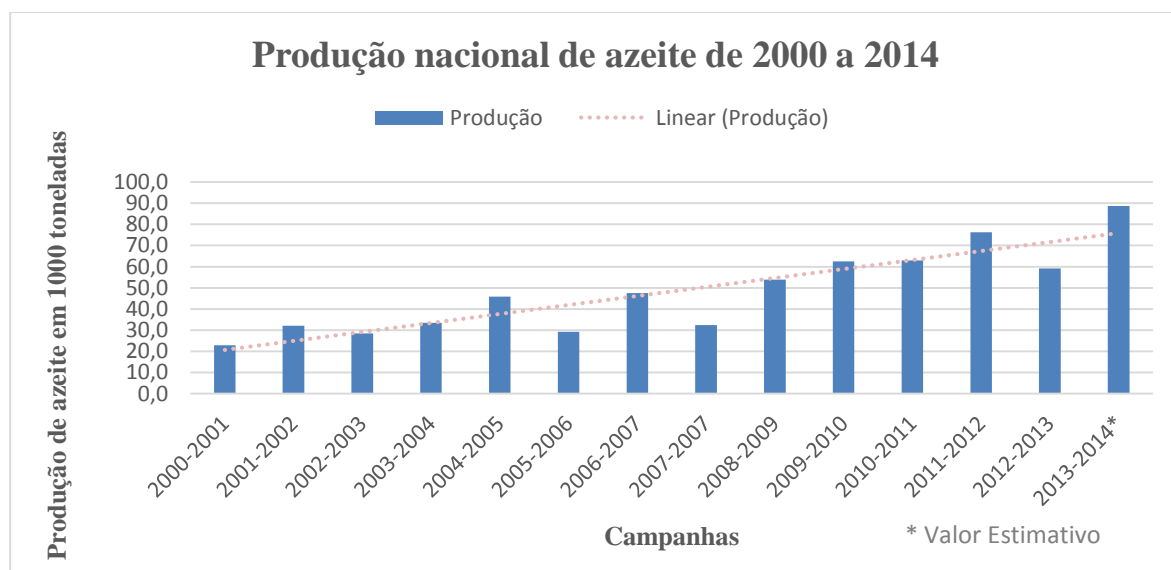
Em relação aos fluxos comerciais a nível mundial, as importações e exportações apresentam-se relativamente equilibradas, dando indicação de que este é um setor que não gera excedentes. Ao nível das trocas internacionais, os principais países exportadores são em grande parte países produtores, sendo a UE responsável por 66% das exportações mundiais (1 328 000 toneladas) (COI, 2014).

#### 4.1.2. Produção, Importação e Exportação em Portugal

Tendo por base os resultados preliminares do inquérito efetuado aos lagares de azeite, realizado pelo GPP (Gabinete de Planeamento e Políticas), através do SIAZ (Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa), a produção nacional de azeite superou as

86 mil toneladas, na campanha de 2013/14, o que representa um aumento de cerca de 43% em relação à produção média das últimas 5 campanhas.

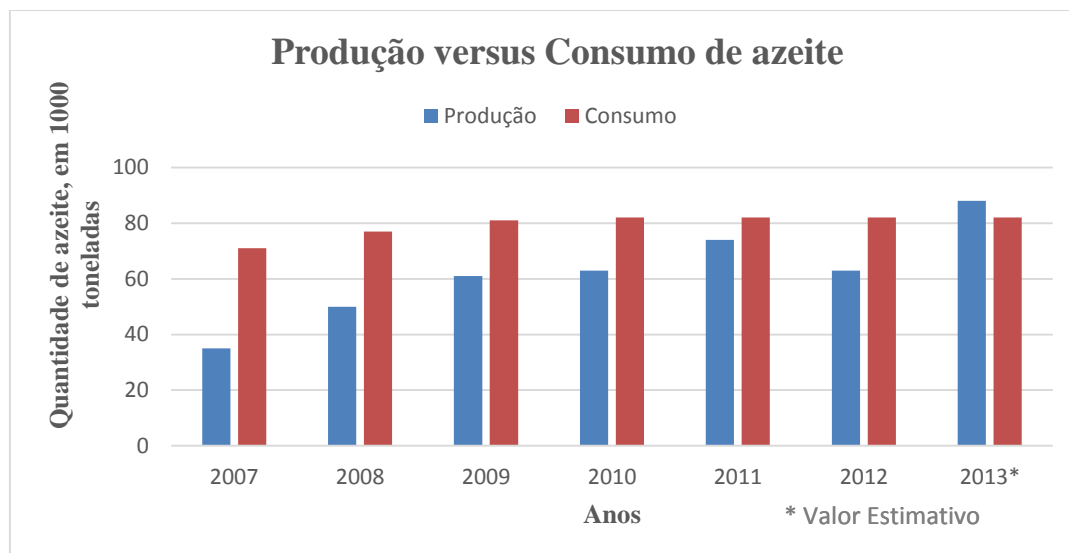
Os investimentos que têm sido feitos nos últimos anos, aliados às boas condições climáticas e fisiológicas, colocaram a produção de azeite, na campanha de 2013-2014, em valores recorde dos últimos 50 anos. Segundo o INE (Instituto nacional de Estatística), a produção de azeite nesta última campanha estimou-se em 88733 toneladas (Figura 9), correspondendo a uma produtividade média nacional de 1730 kg/ha. Portanto, a balança comercial neste produto é positiva, da ordem dos 60 milhões de euros. Os dados divulgados pelo INE apontam para um valor global de 999,9 mil hectolitros, o que representa um crescimento de 55 por cento face ao ano anterior, pois no período de 2009 a 2012 a média de produção de azeite foi de cerca de 710 mil hectolitros, o que consolida a posição do país como 4º maior produtor a nível europeu e o 7º a nível Mundial (OJE, 2014;CAP, 2014; CONFRAGI, 2014).



**Figura 9-** Evolução da produção nacional de azeite desde 2000 até 2014 (dados de CAP, 2014).

Face a estes dados, é possível verificar que a quantidade produzida é superior à quantidade consumida, tornando Portugal autossuficiente em azeite, o que já não acontecia desde 1992 (Figura 10). Esta evolução só foi possível devido às condições meteorológicas

favoráveis ao longo do ciclo de produção da azeitona, e a produção intensiva de novos olivais, são as razões apontadas para esta melhoria dos resultados nacionais do setor.



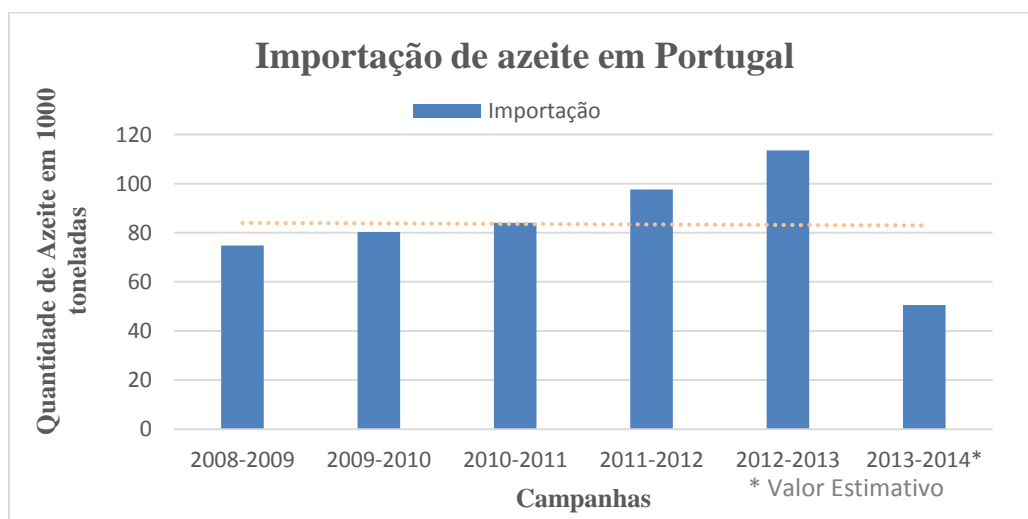
**Figura 10-** Evolução da produção nacional versus Consumo desde 2007 até 2013 (dados de CAP, 2014).

Atualmente, a cultura da oliveira encontra-se distribuída por todas as regiões agrárias do continente Português e a área de produção é de cerca de 400 mil hectares de olival. A vocação dominante do olival português é para a produção de azeite, com cerca de 96% do total de azeitona produzida destinada a azeite e apenas 4% canalizada para a produção de azeitona de mesa. Como se pode ver pela Figura 11, o Alentejo é a principal região produtora com 71,6% da produção nacional, seguindo-se a região Norte com 15,2% e, por fim a região Centro, com 7,7% da produção nacional (CAP, 2014).



**Figura 11-** Distribuição regional de azeite extraído, em percentagem (dados de CAP, 2014).

Relativamente á importação de azeite, o principal fornecedor do mercado nacional é Espanha, seguindo-se França, Itália e Tunísia. Portugal ao longo das últimas seis campanhas importou uma média de 83 mil toneladas de azeite. A maior percentagem de azeites importados são azeites virgens (61%), mas a expectativa é que este valor continue a diminuir ao longo dos próximos anos (Figura 12).

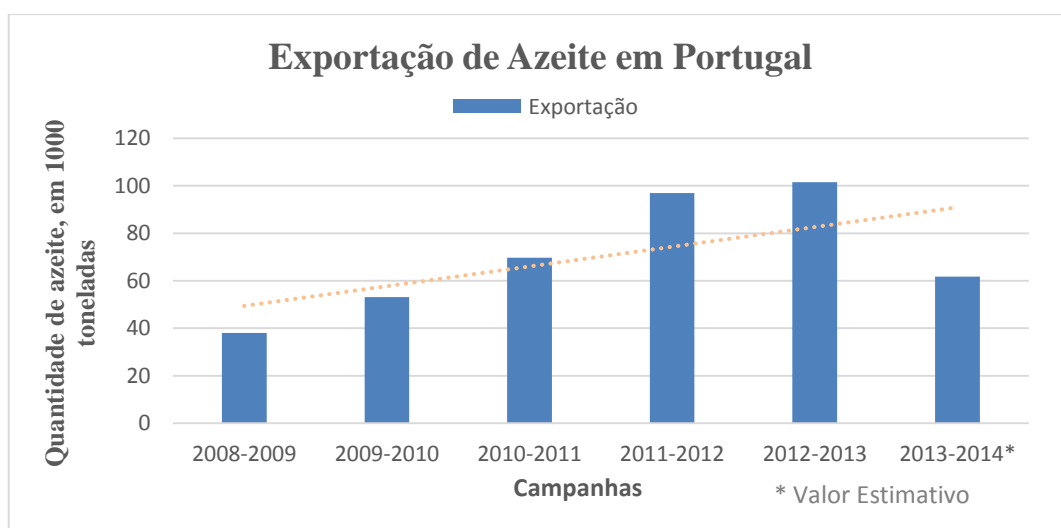


**Figura 12-**Quantidade de azeite importado em Portugal durante as sucessivas campanhas (dados de CAP, 2014).



Em relação á exportação, nas últimas campanhas foram atingidos os valores mais altos (em média 72 mil toneladas), o que faz prever um futuro risonho para a exportação de azeite nacional. O volume global de exportação será da ordem dos 250 milhões de euros/ano. Como se pode verificar na figura 13, este ano Portugal exportará cerca de 70 mil toneladas de azeite, segundo valor estimado pelo INE.

Estes valores confirmam, mais uma vez, a crescente aceitação do azeite português nos mercados internacionais. Um dos fatores mais importantes e decisivos para os elevados valores de exportação do azeite nacional recai na sua elevada e reconhecida qualidade. Os principais países para onde se exporta azeite são o Brasil, seguido de Angola, Estados Unidos, China, França, Venezuela, entre outros (Santos, 2011).



**Figura 13-** Quantidade de azeite exportado em Portugal durante as sucessivas campanhas (dados de CAP, 2014).

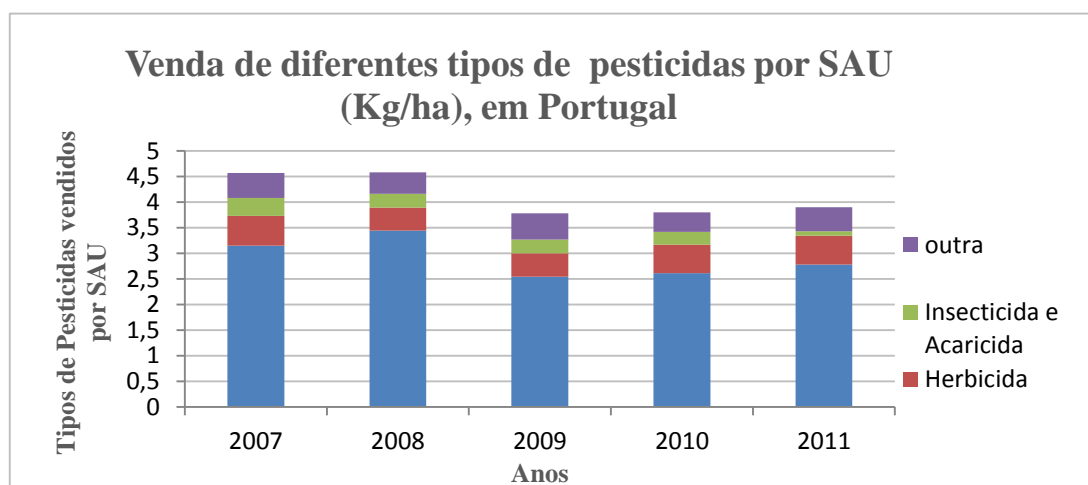
Mas, apesar do crescimento da produção e de muita dela ser para o mercado externo, ainda é preciso importar para satisfazer boa parte, precisamente, da exportação. De acordo com dados do INE, no bolo total das exportações portuguesas, o Brasil pesa 57% em valor. Os primeiros oito meses do ano renderam 93 milhões de euros em vendas para este mercado, mais 35% face ao período homólogo.

Quanto ao futuro, as estimativas da Casa do Azeite para os próximos anos são de contínuo crescimento. No período entre 2016 e 2020 a previsão média é de um aumento nas exportações de 30% comparando com os anos 2011-2014. Até 2020, Portugal pode chegar às 98 mil toneladas, o que não é de todo exagerado, mas não chega para as exportações (Casa do Azeite, 2014).

## 4.2. Análise de Mercado aos Pesticidas

A aplicação de pesticidas aumentou em 50% no mundo, desde 1950. Atualmente, a produção industrial de pesticidas é de  $2,5 \times 10^9$  kg/ano. Segundo o *Eurostat economic accounts for agriculture*, no ano de 2000, em Portugal, gastou-se 37,9 €/ha em superfícies agrícolas, sendo que, em 2005 o valor aumentou para os 70,6 €/ha (Eurostat, 2014; Chiaradia, 2009).

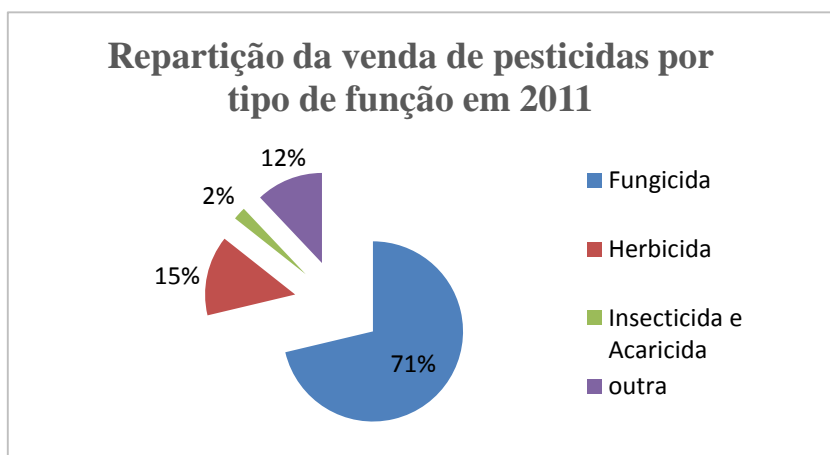
De acordo com a estimativa do INE, entre os anos 2007 a 2011 os fungicidas foram os pesticidas que apresentaram maiores quantidades vendidas por SAU (Superfície Agrícola utilizada) em Portugal. Em segundo lugar aparecem os Herbicidas, seguindo-se de um conjunto de pesticidas agrupados numa classe a que se chamou outros, e que inclui nemacidas, formicidas, moluscidas, entre outros. Em último aparecem os inseticidas e acaricidas, como se pode ver na Figura 14.



**Figura 14-** Venda de pesticidas por superfície agrícola (Kg/ha), em Portugal entre os anos 2007-2011 (dados de INE, 2014).

Como se pode verificar, nos anos de 2007 e 2008, em Portugal, a venda de pesticidas por unidade de superfície agrícola, foi aproximadamente de 4,5 kg por hectare. Através da figura anterior é possível observar as variações do volume de vendas de pesticidas, observadas durante o período de 2007 a 2011, que ficaram a dever-se sobretudo às flutuações na comercialização dos fungicidas, em função das condições climáticas como seca, chuvas intensas, temperatura elevada e queda de granizo.

Analisando as vendas por tipo de função mais significativas, em 2011, os fungicidas representaram 71% do total de vendas (cerca de 2,8 kg/ha), no entanto, a comercialização de herbicidas apesar de assumir uma quota de apenas 15% no total de vendas, com cerca de 0,6 kg/ha, tem marcado posição no mercado (Figura 15). Já com os inseticidas e acaricidas, o total de vendas foi de 2% nesse ano, dando-se um decréscimo acentuado das vendas, o que poderá dever-se ao condicionamento da aplicação de pesticidas no âmbito das medidas agroambientais (INE, 2014).



**Figura 15-** Repartição da venda de pesticidas segundo o tipo de função (dados de INE, 2014).

Brasil, Índia, França e México estão, atualmente, entre os maiores consumidores de pesticidas do mundo. Os principais produtores são os EUA, a Argentina e o Japão (Chiaradia, 2009).



## Capítulo 5- Materiais e Métodos

O desenvolvimento experimental do trabalho consistiu na implementação e aplicação de métodos analíticos para determinar resíduos de pesticidas em amostras de azeite. As amostras foram preparadas pelo método Quechers, que foram otimizadas para alcançar maior eficiência de extração e análise por GCMS.

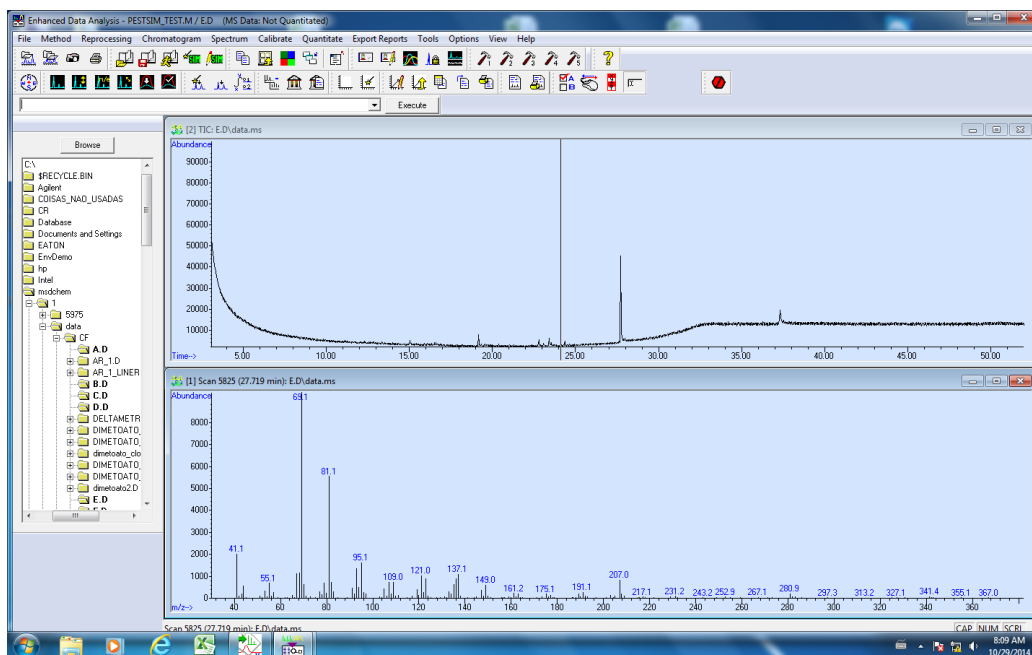
### 5.1. Materiais e reagentes

Frascos de cor âmbar (100 ml) com tampa rosqueável, tubos (15 e 50 ml) proveniente do *kit* de extração roQ, saqueta KSO-8911 (proveniente do *kit* de extração roQ), máscara adequada, *vials*, *micro-inserts*, rolhas e restante material de vidro corrente de laboratório.

Os solventes usados neste trabalho foram: Acetonitrilo LiChrosolv (Merck, 99% de pureza), Acetona Lichrosolv (Merck, 99,8% de pureza), Ácido Acético Analar Normapur (VWR Chemicals, 100% de pureza) e uma solução de ácido acético/acetonitrilo (1:99). Os padrões de resíduos de pesticidas e o padrão interno foram adquiridos na Dr. Ehrenstorfer, Alemanha, com um grau de pureza entre 96,4% e 99.9%.

#### 5.1.1. Limpeza dos materiais

O material de vidro foi previamente limpo com solução aquosa de detergente neutro concentrado da Shvredan Plus VK9, e de seguida lavado na máquina de lavar com neutralizador e detergente da Dr. Weigert. Depois da lavagem, passou-se o material pelo solvente que é utilizado na preparação das soluções e retirou-se uma alíquota parte para um *vial* para se injetar no GCMS (Figura 16). Esta ação serviu para testar possíveis contaminações no material. Se o material estivesse contaminado, era repetido o mesmo procedimento tantas vezes quantas necessárias, caso contrário, procede-se à secagem em estufa a 50°C durante 15 minutos.



**Figura 16-** Cromatograma de uma limpeza de um balão volumétrico.

Através da análise da figura anterior foi possível constatar que o balão volumétrico estava contaminado com Esqualeno, que é um ácido gordo que está presente no azeite, portanto, repetiu-se novamente o procedimento descrito anteriormente.

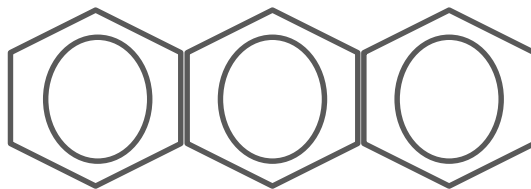
## 5.2. Equipamentos e instrumentação

Para efetuar as análises utilizaram-se os seguintes equipamentos/ instrumentação: Balança analítica Mattler Toledo, modelo AG204; Micropipetas automáticas com capacidade variável (20-200, 100-1000 µl); GC 7890A acoplado ao espectrômetro de massas 5975C da Agilent Technologies; Centrifuga Rotofix 32A- Hettich Zentrifugen; Vortex RS Lab-6Pro, Estufa HERAEUS (50-300°C) e Ultrassons da VWR.

## 5.3. Padrão Interno e Resíduos de pesticida

O Padrão interno escolhido para o método em estudo foi o Antraceno (Figura 17), Esta escolha foi baseada nas suas características físico-químicas semelhantes aos pesticidas, por não reagir com as substâncias ou outro componente da matriz, não estar presente nas amostras de azeite para análise e, quando cromatografada não coeluir com os

pesticidas estudados. Embora este último requisito não ser impeditivo, pois a deteção é feita por espectrometria de massas, na qual cada composto produz um espectro característico.

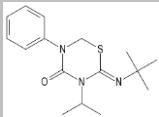
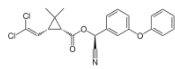
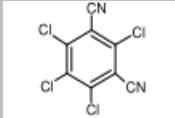

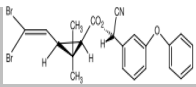
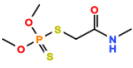
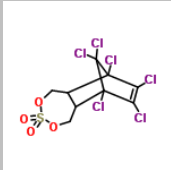
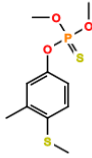
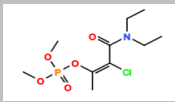
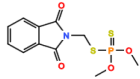


**Figura 17-** Estrutura molecular do Antraceno.

Para o método já implementado na empresa o padrão interno utilizado é o endossulfão-sulfato, que se encontra referenciado na tabela seguinte.

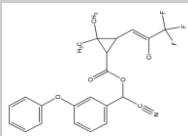
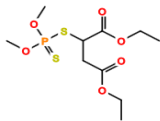
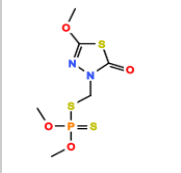
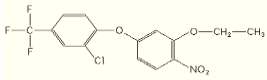
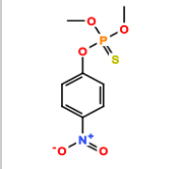
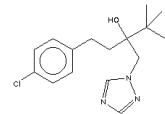
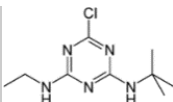
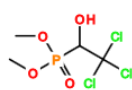
Os pesticidas alvo deste trabalho foram definidos tendo em conta a cultura em estudo (Oliveira), bem como uma análise feita à sua solubilidade. Concluiu-se que se dividem em lipossolúveis e hidrossolúveis. Sendo que os hidrossolúveis ficam retidos no processo de extração do azeite. Deste modo, a Tabela 3 apresenta a lista de pesticidas lipossolúveis que são objeto deste estudo, bem como outras informações relevantes, como a sua estrutura, o grupo químico, o modo de ação e os limites máximos de resíduos fixados pela União Europeia (Regulamento (EC) N° 396/2005).

**Tabela 3-** Características dos pesticidas selecionados para este estudo.

Pesticida	Estrutura	Grupo Químico	Modo de Ação	LMR (mg/Kg)
<b>Buprofezina</b>		Piretróide	Inseticida/ Acaricida	5
<b>Cipermetrina</b>		Piretróide	Inseticida/ Formicida	0,05
<b>Clortalonil</b>		Isoftalonitrila	Fungicida	0,01
<b>Clorpirifos- Etil</b>		Organofosforado	Inseticida/ Acaricida	0,05
<b>Deltametrina</b>		Piretróide	Inseticida/ Formicida	1
<b>Dimetoato</b>		Organofosforado	Inseticida/ Acaricida	2
<b>Endossulfão- Sulfato</b>		Organoclorado	Inseticida/ Formicida/ Acaricida	0,05
<b>Fentião</b>		Organofosforado	Inseticida/ Formicida/ Acaricida/ Cupinícida	0,01
<b>Fosfamidão</b>		Organofosforado	Fungicida/ Inseticida	0,01
<b>Fosmete</b>		Organofosforado	Inseticida	3



**Tabela 3-** Características dos pesticidas selecionados para este estudo (Continuação).

Pesticida	Estrutura	Grupo Químico	Modo de Ação	LMR (mg/Kg)
<b>Lambda-Cialotrina</b>		Piretróide	Inseticida	1
<b>Malatão</b>		Organofosforado	Inseticida/ Acaricida	0,02
<b>Metidatião</b>		Organofosforado	Inseticida	0,02
<b>Oxifluorfena</b>		Difenil Eter	Herbicida	1
<b>Paratião-Metil</b>		Organofosforado	Inseticida/ Acaricida	0,02
<b>Tebuconazol</b>		Triazol	Fungicida	0,05
<b>Terbutilazina</b>		Triazina	Herbicida	0,05
<b>Triclorfão</b>		Organofosforado	Inseticida	0,02

O comportamento de um pesticida pode ser estimado pelas suas características físico-químicas e pelos seus metabólitos ou produtos de degradação. A Tabela 4 mostra algumas propriedades físico-químicas dos padrões de pesticidas selecionados para o estudo

**Tabela 4-** Propriedades físico-químicas dos padrões selecionados para o estudo.

<b>Padrões</b>	<b>Fase</b>	<b>Massa Molecular, g/mol</b>	<b>Ponto de Ebulição, °C</b>	<b>Pressão de vapor (mPa), 25°C</b>	<b>Solubilidade em água (g/L), 25°C</b>	<b>Pureza, %</b>
<b>Antraceno (Padrão Interno)</b>	Cristalina sólida	178,2	216,8	8	2,2	98,5
<b>Buprofezina</b>	Cristalina Sólida	305,4	104,3	1,25	0,9	99
<b>Cipermetrina</b>	Sólido ceroso	416,3	125	$2,3 \times 10^{-4}$	0,004	98
<b>Clortalonil</b>	Cristalina Sólida	265,9	253,3	0,076	0,0006	99,5
<b>Clorpirifos</b>	Cristalina Sólida	350,6	43,5	2,5	0,002	99,9
<b>Deltametrina</b>	Cristalina Sólida	505,2	100	0,002	$2 \times 10^{-5}$	99,5
<b>Dimetoato</b>	Cristalina Sólida	229,3	50,3	1,1	25	99,5
<b>Endossulfão-Sulfato</b>	Cristalina Sólida	422,9	179,4	1,07	1,063	98,5
<b>Fentão</b>	Líquida	278,3	87	4	0,02	99
<b>Fosfamidão</b>	Líquida	299,7	356	3,3	0,20	96,4
<b>Fosmete</b>	Cristalina Sólida	317,3	72,1	70	0,02	98

**Tabela 4-** Propriedades físico-químicas dos padrões selecionados para o estudo (Continuação).

<b>Padrões</b>	<b>Fase</b>	<b>Massa Molecular, g/mol</b>	<b>Ponto de Ebulição, °C</b>	<b>Pressão de vapor (mPa), 25°C</b>	<b>Solubilidade em água (g/L), 25°C</b>	<b>Pureza, %</b>
<b>Lambda-Cialotrina</b>	Cristalina Sólida	449,9	50	$2 \times 10^{-4}$	0,005	98
<b>Malatião</b>	Líquida	330,3	156	5,3	0,145	99
<b>Metidatião</b>	Cristalina Sólida	302,3	39	0,186	0,25	98
<b>Oxifluorfena</b>	Cristalina Sólida	361,7	87	0,0267	$116 \times 10^{-4}$	98
<b>Paratião-Metil</b>	Cristalina Sólida	263,2	36	$0,2 \times 10^{-3}$	18,5	98,5
<b>Tebuconazol</b>	Cristalina Sólida	307,7	100,7	$5,03 \times 10^{-3}$	0,036	98,5
<b>Terbutilazina</b>	Cristalina Sólida	229,7	176,1	0,15	0,0085	98,5
<b>Triclorfão</b>	Cristalina Sólida	257,8	78	0,21	120	99

## **5.4. Procedimento experimental**

### **a) Preparação de Soluções**

#### **Padrão Interno**

Pesou-se na balança analítica 10 mg de Antraceno num balão de 100 ml, adicionou-se uma pequena quantidade de acetonitrilo e levou-se o balão ao ultrassons durante alguns minutos para dissolver totalmente o padrão. Depois perfiz-se o balão com o volume indicado e obteve-se uma Solução-Mãe de 100 ppm. A partir desta solução foi preparada uma solução diluição de 10 ppm e de 1 ppm. A solução de 10 ppm será usada posteriormente no Método de Quechers.

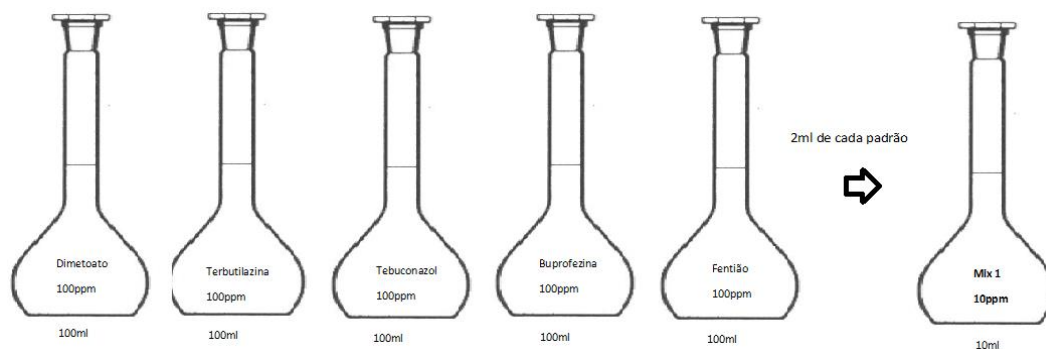
O Padrão Interno, Endossulfão Sulfato, que é usado no método implementado na empresa foi preparado do mesmo modo, só com um solvente diferente, o n-hexano. A solução de 10 ppm será usada posteriormente no método de Quechers.

#### **Padrões de Pesticidas**

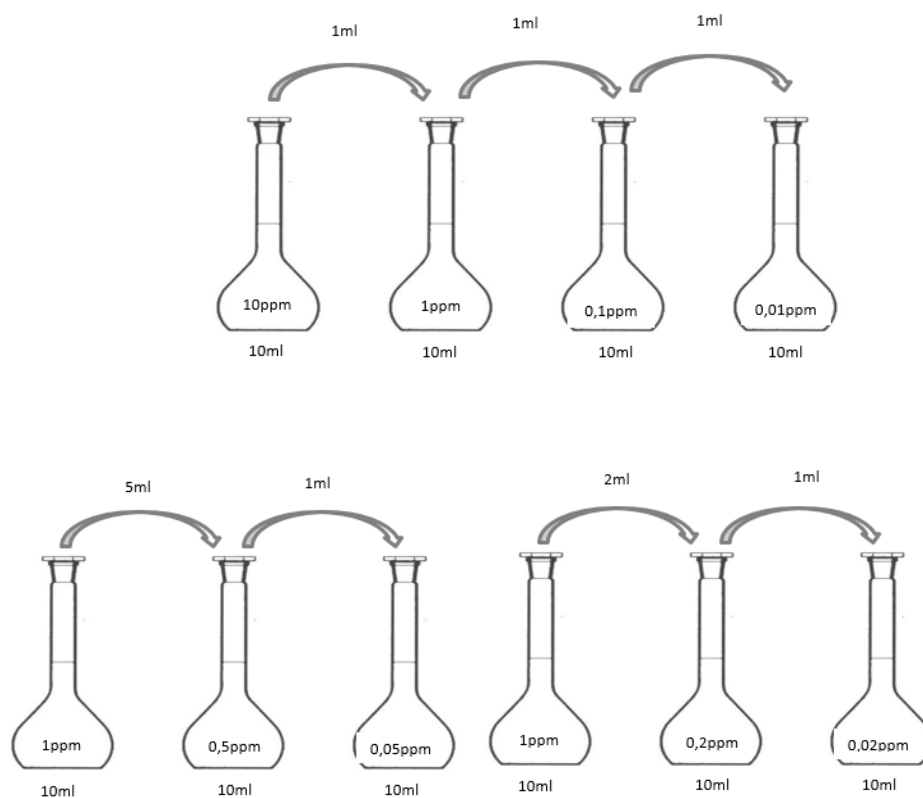
As soluções individuais de cada padrão de pesticida foram preparadas do mesmo modo que o Antraceno. Após a obtenção da solução-Mãe de 100 ppm foram preparadas as respectivas diluições de 1 ppm.

#### **Mix de Pesticidas**

As soluções-mix são constituídas por 5 padrões de pesticidas e foram preparadas a partir das soluções-mãe de 100 ppm. Portanto, para um balão de 10 ml retiraram-se 2 ml de cada um dos padrões para se obter uma concentração de 10 ppm. De seguida, também em balões de 10 ml, efetuaram-se as diluições de 1ppm; 0,5 ppm; 0,2 ppm; 0,1 ppm; 0,05 ppm; 0,02 ppm e 0,01 ppm a partir da solução de 10 ppm preparada anteriormente. O Mix 1 é composto pelo Dimetoato, Terbutilazina, Fentião, Buprofezina e Tebuconazol, já o Mix 2 é constituído pelo Triclorfão, Fosfamidão, Malatião, Metidatião e Lambda-Cialotrina. De seguida, as Figuras 18 e 19 exemplificam a preparação do Mix 1 e as suas diluições.



**Figura 18-** Preparação do Mix 1 de concentração 10 ppm.



**Figura 19-** Preparação das diluições do Mix 1.

Com estas soluções padrão, posteriormente serão construídas as retas de calibração, onde é feita a relação entre a concentração e a resposta.

### **b) Cuidados a ter após a preparação das soluções**

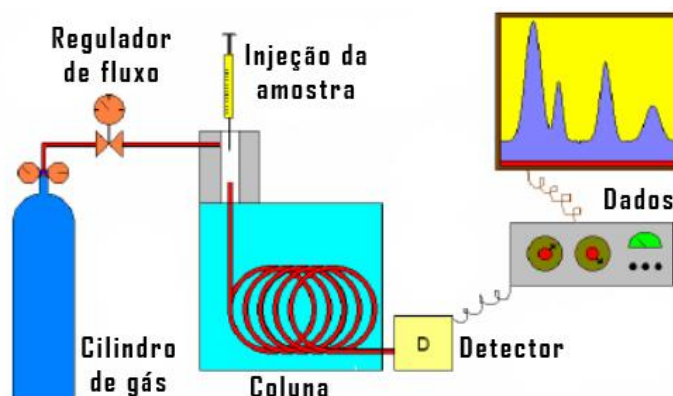
Ao trabalhar com este tipo de soluções deve garantir-se que todas as soluções diluídas são verificadas frequentemente, são observadas todas as precauções para evitar possíveis contaminações com materiais de plástico ou de borracha e são examinadas as impurezas dos padrões analíticos.

No que diz respeito à estabilidade das soluções, quando estas estão guardadas a -20°C, é provável que durem, pelo menos, um a dois anos. Por forma a permitir o equilíbrio das soluções, deve deixar-se que estas atinjam a temperatura ambiente antes de abrir os recipientes onde se encontram.

## **5.5. Métodos analíticos – GCMS**

Como já referi anteriormente, os efeitos adversos provocados por doses residuais de pesticidas na saúde têm representado uma área de preocupação social, portanto, a regularidade de análises de controlo de resíduos nos alimentos passou a ser essencial.

A cromatografia gasosa é um método físico de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase gasosa móvel sobre uma fase estacionária e consiste primeiramente na introdução da amostra numa corrente de gás puro e inerte, que atua como gás de arraste. O fluxo de gás passa pela coluna através da qual os componentes da amostra se deslocam a diferentes velocidades, influenciadas pelo grau de interação de cada componente com a fase estacionária não volátil. As substâncias que têm a maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, portanto, são separadas das de menor interação. À medida que as substâncias eluem da coluna podem ser quantificadas por um detetor. A Figura 20 representa um esquema de um cromatógrafo gasoso.



**Figura 20-** Esquema básico de um cromatógrafo gasoso (Biomedicina Brasil, 2014).

Um cromatógrafo gasoso é constituído por um conjunto de equipamentos, sendo eles o sistema de gases de arraste, injetor, coluna, forno, detetor e um computador, onde são registados os cromatogramas e onde é feito o tratamento de dados.

### **Gás de arraste**

O Gás de arraste deve ser puro e inerte, para que não reaja nem com a amostra nem com a fase estacionária. A escolha do gás de arraste depende do detetor e da eficiência e velocidade de separação desejada e os gases mais usados são o Azoto, Hélio e Hidrogénio. O gás de arraste utilizado neste estudo foi o Hélio e encontra-se comprimido em cilindros. As condições do fluxo de gás são controladas por reguladores de pressão e válvulas de medição (Pereira, 2009).

### **Fase estacionária**

A escolha desta deve ter em atenção um conjunto de propriedades como a volatilidade baixa, estabilidade térmica, coeficientes de partição apropriados para as substâncias em estudo e baixa pressão de vapor à temperatura da coluna. O tempo de retenção depende do coeficiente de partição assim como a natureza da fase estacionária.

Para que se tenha um tempo de retenção razoável na coluna um dado soluto deve ter um certo grau de solubilidade para o solvente (Coulson e Richardson, 1985).

### **Injetor**

As amostras são introduzidas no injetor com a ajuda de uma seringa. O injetor deve estar a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra, para que esta se volatilize completa e instantaneamente e seja introduzida na coluna. A temperatura não deve ser muito elevada pois pode ocorrer a degradação térmica da amostra, sendo normalmente usada entre os 150°C e os 250°C.

Na injeção *splitless* (vaporização sem divisão de fluxo) toda a amostra entra na coluna e é a mais adequada para amostras com baixas concentrações de analito.

### **Coluna**

A separação dos analitos da amostra é feita na coluna capilar. A natureza do suporte sólido, o tipo e quantidade da fase líquida, o método de empacotamento, o tamanho da coluna e a temperatura desta são os vários fatores que determinam a eficiência da separação analítica.

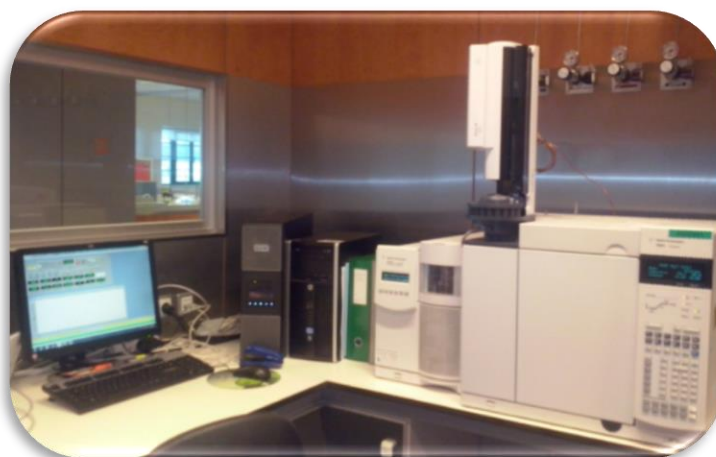
### **Forno**

O forno é onde se encontra a coluna, este é aquecido por ar quente que circula por meio de uma ventoinha.

### **Detetor**

O detetor, situado na saída da coluna, permite registar e medir as pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e eluídos pelo fluxo de gás de arraste. O sinal de saída do detetor alimenta um dispositivo que produz um gráfico denominado *cromatograma*. O detetor usado no desenvolvimento deste trabalho foi o espectrómetro de massa (Figura 21).





**Figura 21-** Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrómetro de massas modelo 5975C da Agilent Technologies.

Atualmente, o MS (espectrómetro de massas) é a melhor técnica de deteção para cromatografia. A sua especificidade, seletividade e limite de deteção característicos são mais que suficientes para enfrentar a maioria dos problemas analíticos. Para obter o espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os iões obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre a sua massa e a sua carga elétrica,  $m/z$ . O espectro de massa apresenta a resposta do detetor contra  $m/z$ . Idealmente a área do pico é proporcional ao valor da abundância.

O MS pode ser operado de duas formas, no modo SCAN (varredura linear) ou SIM (*Selected Ion Monitoring*). O modo SCAN é muito utilizado para fazer o reconhecimento da composição da amostra. O modo SIM pode ser utilizado após a obtenção do tempo de retenção e realizada a seleção dos iões mais representativos do analito alvo. Este modo é o mais indicado para a quantificação de um determinado composto presente na amostra.

A identificação dos compostos é feita por comparação com os compostos presentes na base de dados da biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) e confirmada através da comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa com o dos compostos puros. A biblioteca NIST é uma base de dados que contém espectros de massas e outras propriedades de mais de 163 mil compostos químicos (Pereira, 2009).

### 5.5.1. Condições Cromatográficas

A rampa de temperatura foi ajustada durante a otimização do método, de modo a permitir um melhor desempenho da técnica cromatográfica para os analitos em estudo. Então, a temperatura inicial do forno foi de 120°C durante 2 minutos, com uma taxa de aquecimento de 6°C/min até aos 300°C e mantida por 20 minutos. O tempo da corrida foi de 52 minutos.

As injeções foram realizadas com injetor automático no modo *splitless*. A temperatura do injetor foi de 300°C, foi utilizado um *liner* de quartzo com lã de vidro. O gás de arraste utilizado foi o Hélio (99,99% de pureza) com um fluxo de 3 ml/min e uma pressão de 14,16 psi. O volume injetado foi de 2 µl. Antes e após a injeção são feitas 10 lavagens no Solvente A (Acetona) e 10 no Solvente B (N-hexano). A coluna capilar utilizada foi uma HP-5MS (5% fenil e 95% metilsiloxano) com 30 m de comprimento, 250 µl de diâmetro interno e 0,25 µl de espessura de filme de fase estacionária. O espectrômetro de massas foi operado em modo SCAN/SIM, com fonte de íões por impacto de elétrons (EI) a 1353 eV.

As condições cromatográficas foram gerenciadas pelo *software* GC-MSD *Data Analysis* (Figura 22).

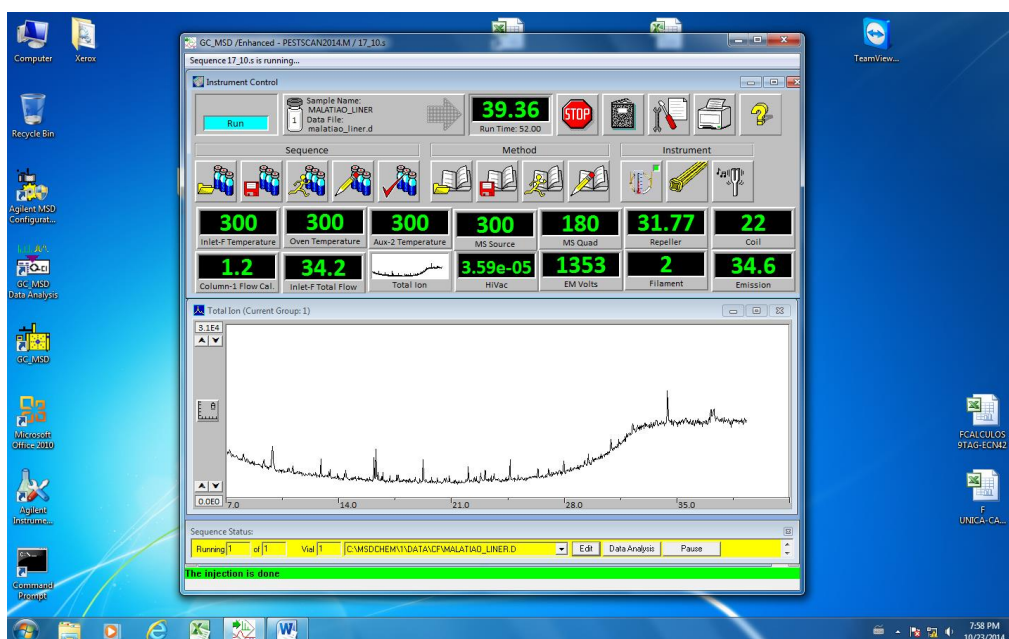
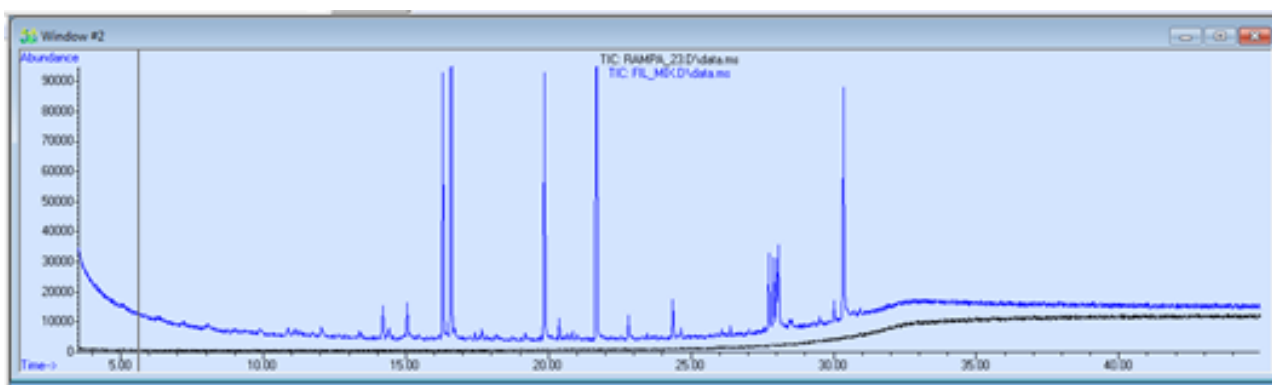


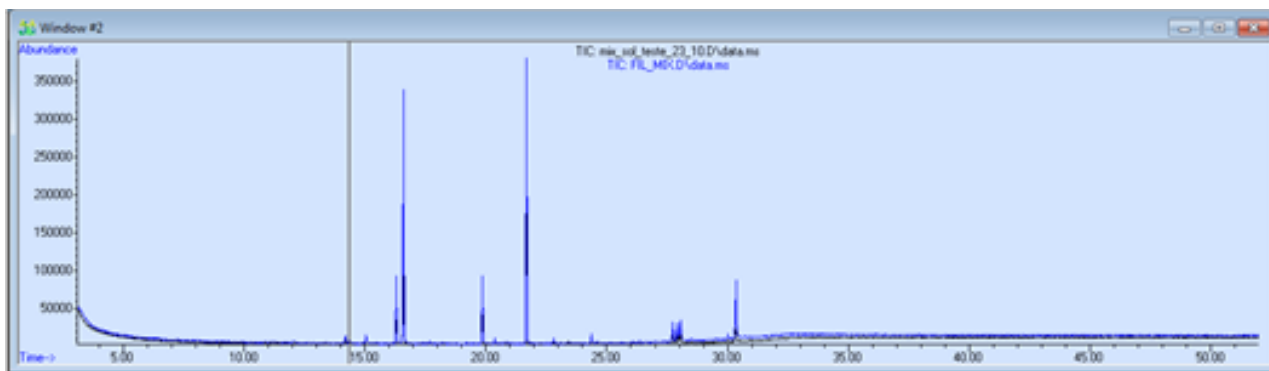
Figura 22- Software GC-MSD *Data Analysis*.

## 5.5.2. Procedimentos de rotina do GCMS

Antes da utilização do GCMS convém realizarem-se alguns testes de rotina para se confirmar que o aparelho está apto para trabalhar. A primeira tarefa é fazer uma injeção de ar em SCAN com o principal objetivo de verificar a linha de base da rampa e possíveis contaminações da seringa e da linha do gás. A próxima tarefa é injetar uma mistura teste de concentração conhecida para testar a reprodutibilidade do aparelho (Figura 23 e 24), fazendo depois uma comparação com a injetada no dia anterior. Outra ferramenta de testes para verificar se está tudo conforme com o aparelho é o *Autotune*, permitindo verificar as condições em que se encontra o aparelho. Se tudo estiver conforme pode-se trabalhar, caso contrário terá de se procurar o problema, ou então chamar o técnico do equipamento.



**Figura 23-** Overlay da linha de base da rampa com a da mistura teste.



**Figura 24-** Overlay de duas misturas teste para testar a reprodutibilidade do aparelho.

Através das imagens anteriores foi possível constatar que não existiam qualquer tipo de contaminações da linha do gás, nem da seringa e que as misturas teste são da mesma ordem de grandeza garantindo a reprodutibilidade do aparelho e evitando erros de análise. Foi possível fazer esta constatação aplicando uma das funções existentes no *software* utilizado o *Overlay-Tic*, que consiste em sobrepor dois cromatogramas diferentes.

## 5.6. Validação de métodos Analíticos

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Durante a validação, um aspeto importante a testar é a estabilidade da resposta do processo analítico, através de injeções de padrões. Os parâmetros analíticos para validação de métodos de separação, segundo o *Eurachem Guide* são os seguintes:

### Identidade/seletividade

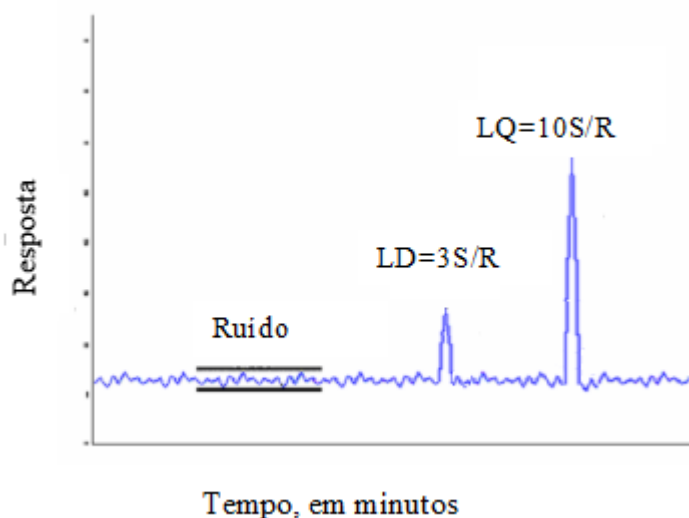
A confirmação da identidade do analito é essencial num processo de validação, pois pretende-se analisar rigorosamente na amostra os analitos sem a interferência de compostos semelhantes ao analito.

A seletividade de um método instrumental de separação é definida como a capacidade de determinação exata de um método, mais especificamente o/s analito/s de interesse na presença de outros componentes numa matriz, nas condições de teste. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. A seletividade precisa de estar assegurada para que a linearidade, a exatidão e a precisão não sejam comprometidas.

### Limite de Deteção e de Quantificação

O Limite de Deteção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detetada, porém não necessariamente quantificada. O Limite de Quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificado com exatidão e veracidade. O LD corresponde à concentração do analito que resulta um sinal 3 vezes o ruído

da linha de base e o LQ corresponde à concentração do analito que produz um sinal ruído superior a 10 (Figura 25). Para a altura do sinal foi utilizada a altura do pico cromatográfico, sendo medida a partir da média da oscilação do ruído.



**Figura 25-** Representação gráfica do ruído da linha de base, do LD e LQ.

O ruído consiste na flutuação da linha de base obtida no cromatograma sendo a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionado a nenhum composto detetado.

### Curva analítica e Linearidade

A calibração é uma das fases mais importantes na análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e consiste na determinação da resposta do GCMS às várias concentrações dos resíduos de pesticidas em estudo. A curva de calibração será construída preparando-se as soluções analíticas padrões de pesticidas, em solvente ou extrato da matriz, nas suas várias concentrações. A curva preparada em solvente relaciona o sinal do GCMS com a concentração do analito, sem considerar a interferência da matriz. No presente caso, optou-se por traçar a reta tendo em conta as interferências que a matriz pode causar no analito. Isto é, utilizando as diferentes concentrações do mix de pesticidas na presença da matriz, utilizando o método de Quechers. A IUPAC (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda seis ou mais níveis de concentração.

Neste caso, foram utilizados 8 níveis de concentração (10 ppm, 1 ppm, 0,5 ppm, 0,2 ppm, 0,1 ppm, 0,05 ppm, 0,02 ppm e 0,01 ppm).

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, numa dada gama de concentrações. Portanto, para a quantificação terá de existir uma relação linear entre a resposta, em forma de sinal, e a concentração do analito. A linearidade é obtida pela equação da reta usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

### **Exatidão/Precisão**

A exatidão é avaliada através da veracidade e da precisão. A veracidade do método corresponde à avaliação de quão o valor determinado está próximo do valor estabelecido como real ou esperado.

A precisão é usualmente determinada em circunstâncias que podem ser modificadas, sendo a quantificação feita através de repetibilidade e reprodutibilidade.

### **Repetibilidade**

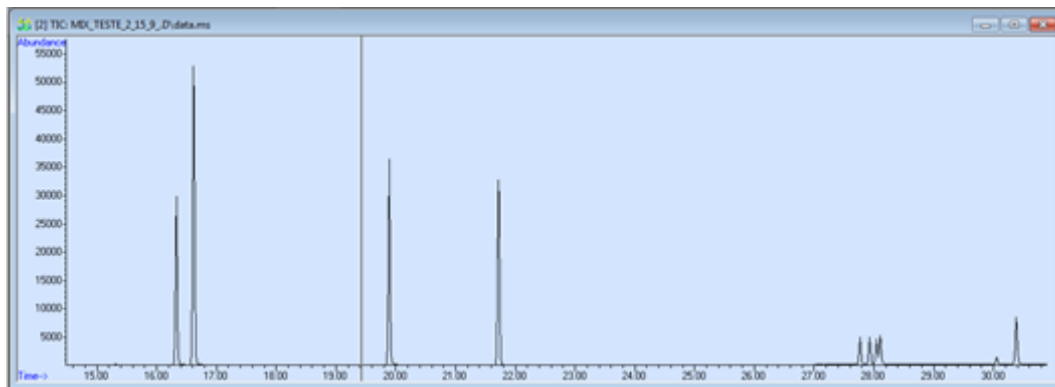
A repetibilidade define-se como a menor precisão esperada, exprimindo a variabilidade esperada quando o método é aplicado por um analista, num equipamento durante um determinado espaço de tempo, isto é nas mesmas condições experimentais. No caso, de existir um estudo entre vários laboratórios, tem mais significado determinar a precisão através da reprodutibilidade.

### **Reprodutibilidade**

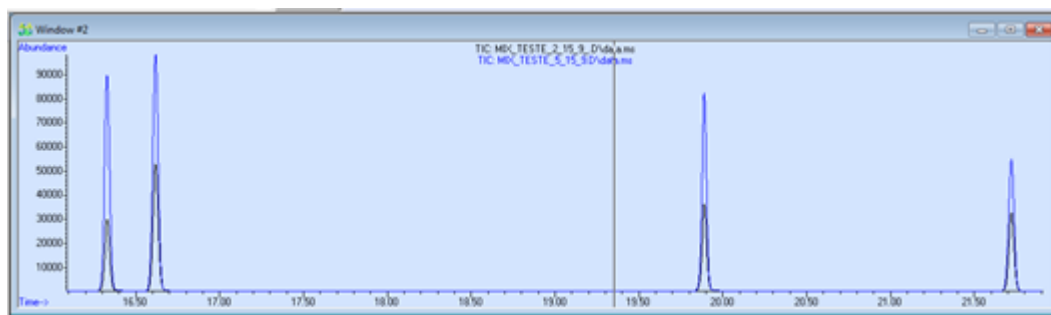
A reprodutibilidade caracteriza-se pela variabilidade esperada quando o método é aplicado, como por exemplo, por vários analistas, em vários equipamentos ou em dias diferentes.

A reprodutibilidade foi testada fazendo 5 injeções de uma mistura teste de concentração conhecida. Observando as Figuras 26, 27 e 28, foi possível verificar que um

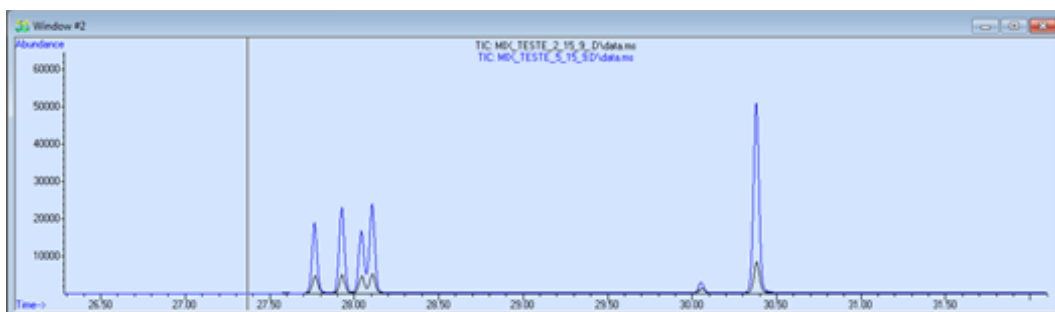
dos grandes obstáculos encontrados foi o facto de, em dada altura, o aparelho não apresentar resultados reprodutíveis.



**Figura 26-** Cromatograma da mistura teste na integra.



**Figura 27-** Overlay dos cromatogramas referentes às injeções dois e cinco, do tempo zero aos 22 minutos.



**Figura 28-** Overlay dos cromatogramas referentes às injeções dois e cinco, do tempo 25 aos 32 minutos.

Através do *Overlay-Tic*, constatou-se que, dois cromatogramas de injeções de *vials* diferentes, mas com a mesma amostra, nas mesmas condições e exatamente no mesmo dia, apresentaram resultados bastante distintos.

Exclui-se, à partida, a primeira injeção, porque a diferença de resultados poderia dever-se a fatores como: bolhas existentes na seringa ou entupimento da mesma, contaminação dos septos dos *vials*, ou contaminações residuais da amostra injetada anteriormente; descartando assim a possibilidade de erros de análise dos dados obtidos com os anteriores.

### Percentagens de Recuperação

Normalmente, os métodos analíticos não quantificam exatamente o analito na amostra. Deste modo, é necessário conhecer a eficiência do método ao extrair o analito na sua matriz.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos, geralmente está entre os 80 e os 120%, com um coeficiente de variação até  $\pm 20\%$ . Portanto a Recuperação será:

$$\text{Rec (\%)} = (\text{concentração}_1 / \text{concentração}_2) * 100 \quad (1)$$

Onde,

C<sub>1</sub>- concentração relativa do analito no extrato;

C<sub>2</sub>- concentração do analito na solução padrão.

### Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. É representada pelo declive da reta de calibração, e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. Mudanças na resposta do instrumento correspondem a uma mudança da concentração do analito (*Eurachem*, 2005).

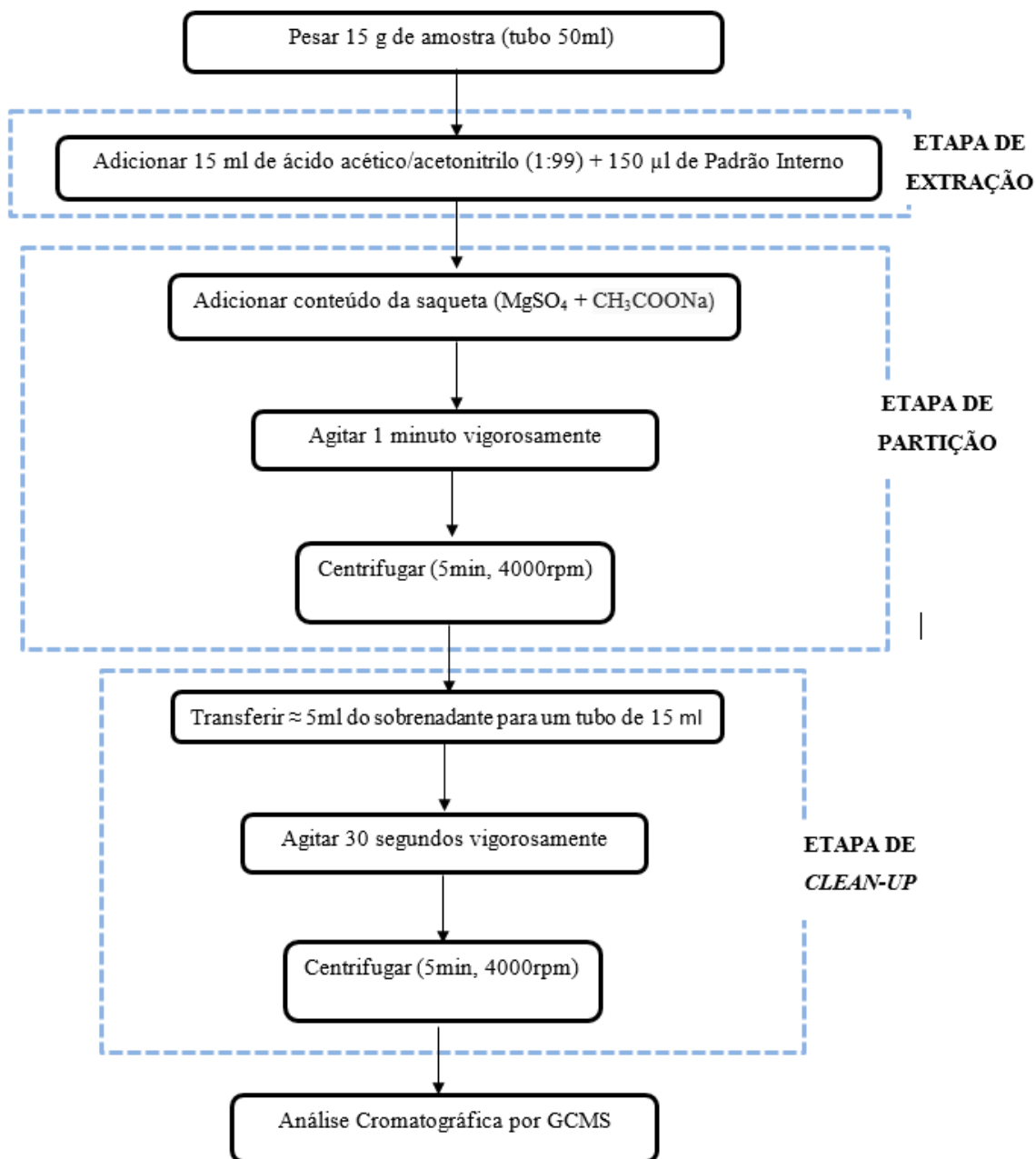


## 5.7. Método Multiresíduo de Extração - Quechers

Na análise de resíduos de pesticidas há a necessidade de uma etapa prévia de preparação da amostra antes da análise instrumental devido á complexidade das matrizes, concentrações extremamente baixas dos analitos, bem como apresentarem propriedades químicas muito distintas. Os principais objetivos de preparação da amostra são, portanto, promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse da matriz, e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. Desta maneira, a preparação da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico.

As novas tendências em preparação de amostras são o desenvolvimento de métodos que aumentem a precisão, a reprodutibilidade e a relação custo-benefício. Entre os procedimentos de preparação de amostra que têm sido largamente empregues para a determinação de resíduos de pesticidas em matrizes complexas destaca-se o método de extração **Quechers**.

O método de extração Quechers (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi criado com o principal objetivo de superar limitações práticas de outros métodos de extração multiresíduos já existentes. Este método tem as vantagens principais de ser um método rápido, fácil, económico, efetivo, robusto e seguro, tal qual como o nome indica. Este método, implementado como método AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) é baseado numa extração com acetonitrilo, seguido de partição líquido-líquido (adição de  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) e posterior etapa de *clean-up* com SPE dispersiva (Sampaio, 2011). A figura 29 apresenta um esquema representativo do método Quechers.



**Figura 29-** Fluxograma representativo do Método Quechers.

As etapas típicas do Método Quechers são descritas de seguida:

### Solvente de Extração

A escolha do solvente de extração é um passo crucial no desenvolvimento do método. Muitos aspetos devem ser considerados incluindo:

- Habilidade para extrair uma ampla faixa de pesticidas orgânicos de diferentes polaridades;
- Apresentar seletividade, que pode ser adquirida durante a extração, partição e *clean-up*;
- Separação da fase gasosa;
- Compatibilidade com as técnicas de separação;
- Custo, segurança e aspetos ambientais.

O solvente mais usado para a extração é o acetonitrilo, no entanto, apresenta vantagens e desvantagens. O acetonitrilo quando comparado com a acetona ou o acetato de etilo proporciona uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos (ceras, gorduras e pigmentos lipofílicos) provenientes da amostra. Além disso, apresenta a vantagem de extrair uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades e quando acidificada, permite recuperações satisfatórias para pesticidas que, geralmente apresentem problemas de estabilidade. No método Quechers o acetonitrilo foi escolhida como solvente de extração usando 15 ml do solvente para 15 g de amostra, resultando uma relação de 1g de amostra para 1ml de solvente (Prestes *et al.*, 2009).

### **Padrão Interno**

A propagação dos erros nas etapas do método Quechers foi monitorizada através da utilização do padrão Interno Antraceno.

### **Adição de Sais**

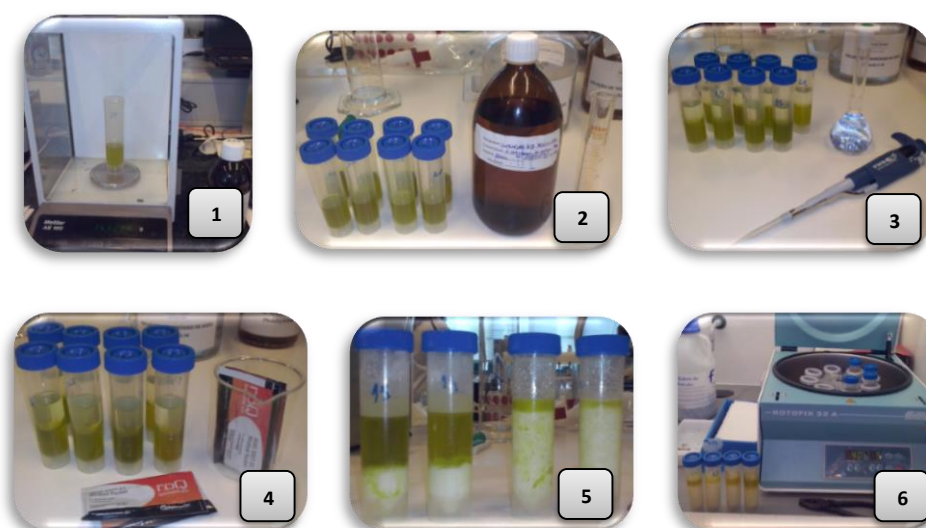
A adição de sais na etapa de partição promove o efeito “*salting-out*” propiciando melhores percentagens de recuperação para analitos polares. Isto ocorre porque a adição de sais faz diminuir a solubilidade destas substâncias na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. Portanto, no desenvolvimento do método Quechers foi utilizada uma mistura de 6g de  $MgSO_4$  e 1,5g de  $CH_3COONa$ . O  $MgSO_4$  é usado devido á grande capacidade de remover água quando comparado com outros sais e o  $CH_3COONa$  tampona a amostra para estabilizar o pH (Sampaio, 2011).

### ***Clean-up***

A etapa de *clean-up* é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. Um novo método de *clean-up* é denominado extração em fase sólida dispersiva (D-SPE), onde 5 ml do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 0,4 g do sorvente amina primária-secundária (PSA), 1,2 g de  $\text{MgSO}_4$  e 0,4 g do sorvente octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ). PSA é um adsorvente de troca iónica fraco com habilidade de remover ácidos gordos e outros co-extrativos interferentes da matriz que formam ligações de hidrogénio. O  $\text{C}_{18}$  é usado essencialmente para matrizes com um teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como gorduras e lípidos.  $\text{MgSO}_4$ , como referi anteriormente, permite a remoção de água residual, proporcionando um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos polares (Cabrera *et al.*, 2012).

#### **a) Método de preparação das amostras de azeite**

De seguida é definido o procedimento para a purificação da amostra a analisar pelo Método de Quechers.





1- Pesagem de 15g da amostra homogenizada para um tubo limpo de 50 ml; 2- Adição de 15 ml de ácido acético/acetonitrilo (1:99); 3- Adição de 150 µl de Padrão Interno; 4- Adição do conteúdo da saqueta KSO-8911; 5- Agitação manual; 6- Centrifugação; 7-Transferência de aproximadamente 5ml do sobrenadante do processo de extração para um tubo de 15 ml e agitação manual; 8- Centrifugação; 9 e 10- Transferência do sobrenadante desejado para um vial; 11- Análise das amostras em SIM/SCAN por GCMS.

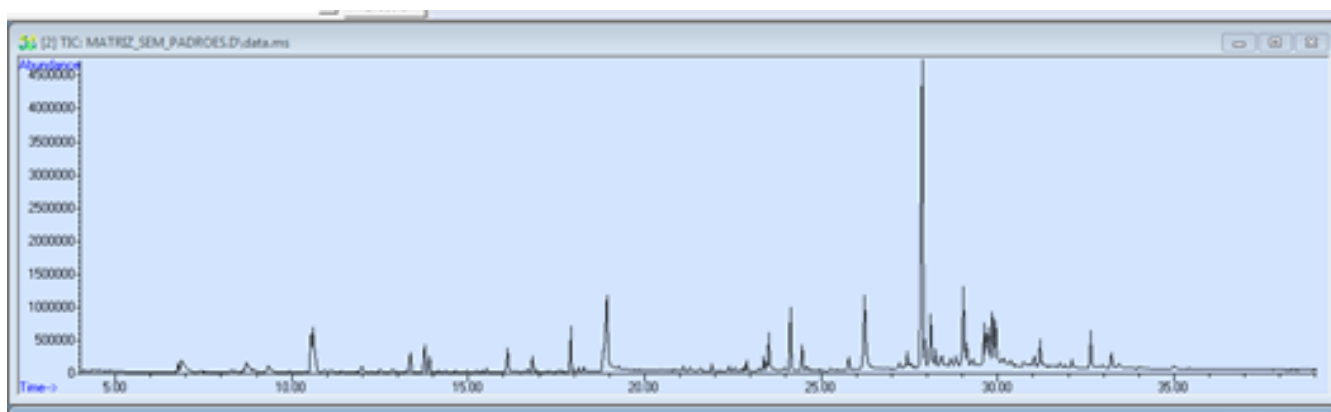
**Figura 30-** Passos analíticos para a realização do método de Quechers.

### b) Relação entre Quechers e Calibração

Inicialmente, foi escolhida uma matriz de azeite isenta de pesticidas, previamente analisada num laboratório externo de análises de contaminantes. Esta mesma matriz foi utilizada durante todo o processo de calibração, garantindo assim que não haveriam quaisquer resíduos de pesticidas a interferir no processo. Desta mesma matriz de azeite, foi feita uma análise com o método de Quechers, isenta de quaisquer padrões, verificando assim o efeito da matriz após a sua extração (Figura 31). O efeito de matriz define-se, na cromatografia gasosa, como a diferença de intensidades e formatos dos picos cromatográficos obtidos quando analisados na presença e ausência desta. Este fenómeno

existe devido ao bloqueio dos sítios ativos do injetor pela matriz, prevenindo a adsorção e degradação térmica dos analitos. Potencia-se ou diminui-se assim, a passagem dos analitos do injetor para a coluna cromatográfica (Pereira, 2009).

O cromatograma da matriz após aplicação do método foi comparado com os cromatogramas dos padrões individuais (SCAN e SIM), de modo a verificar qual poderia ser a sua interferência na posterior análise de cada um dos resíduos de pesticidas, garantindo total qualificação e quantificação dos mesmos.



**Figura 31-** Cromatograma da matriz isenta de padrões, em SIM.

Para efeitos da calibração foi efetuado o método de Quechers como descrito anteriormente, à exceção do ponto número 3 onde não foi adicionado apenas o padrão interno, mas também 1ml de cada concentração do Mix a calibrar.

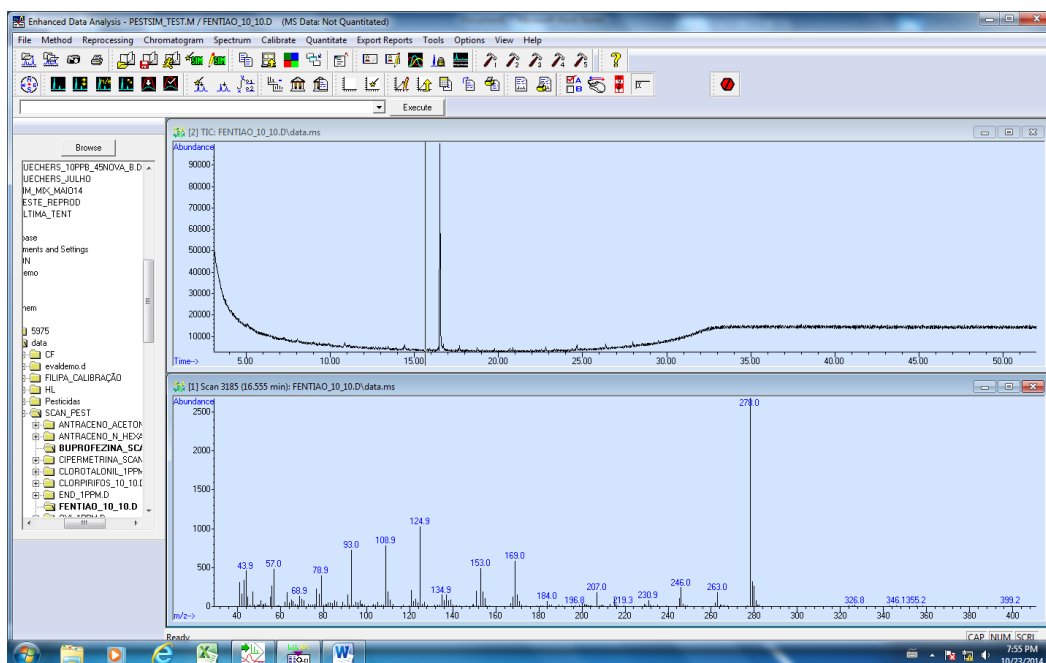
## Capítulo 6- Resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados cromatográficos do trabalho desenvolvido. Inicialmente, começou-se por conhecer os diferentes compostos, as suas características e a sua cromatografia, que se apresenta nos tópicos seguintes.

### 6.1. Análise de Pesticidas- Implementação de um método novo

#### 6.1.1. Resultados Cromatográficos – Padrões individuais

Após a preparação das soluções-padrão retirou-se cerca de 25 µl de cada uma para um *vial* e correu-se as amostras em SCAN e depois em SIM. O método SCAN foi usado para a comprovação da identidade de cada composto, como se pode comprovar pela Figura 32, onde é dado um exemplo do resíduo Fentião.



**Figura 32-** Cromatograma do Fentião mostrando o seu tempo de retenção e o espectro de massas, em SCAN.

Com base na análise cromatográfica, em SCAN e na biblioteca NIST (Figura 33), foram definidos dois iões maioritários para cada composto, sendo um de quantificação e outro de qualificação. Através desta mesma análise, conseguiu-se observar o tempo de

retenção dos diferentes compostos para estas condições cromatográficas, isto é, o tempo decorrido desde o momento da injeção, até ao ponto mais alto do pico.

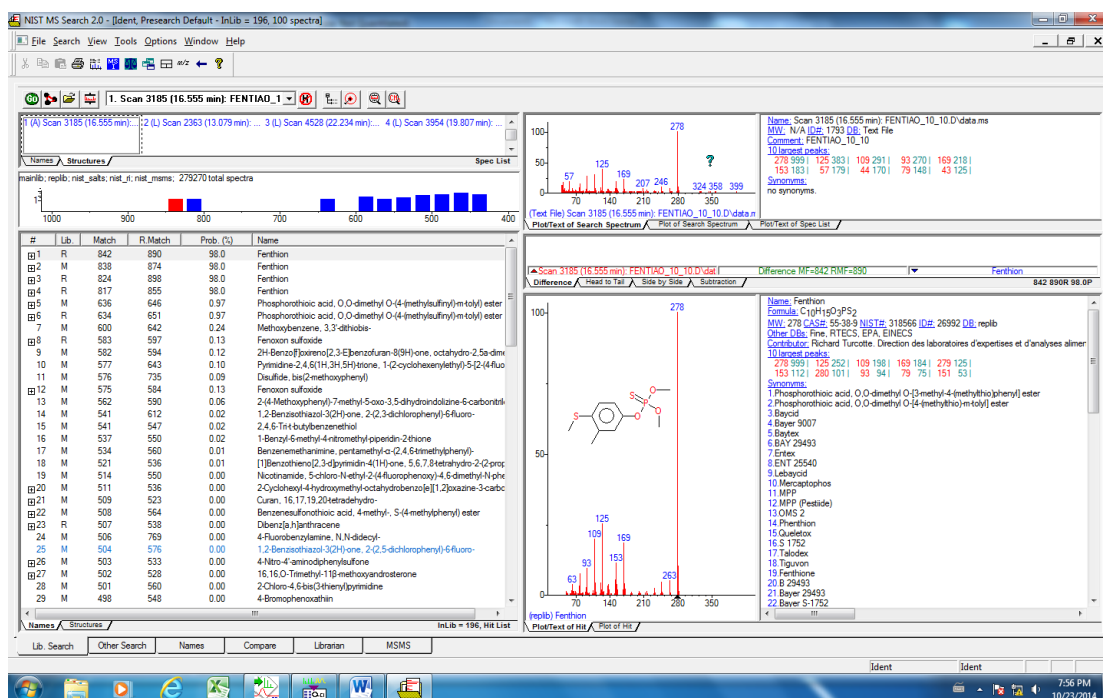


Figura 33- Biblioteca NIST do padrão Fentião.

Os resultados dos iões selecionados para análise de cada composto e os seus tempos de retenção são apresentados na Tabela 5.

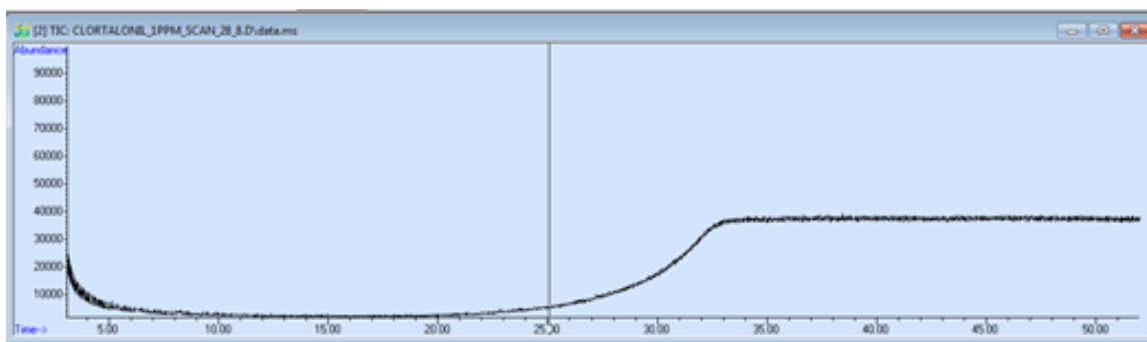


**Tabela 5-** Padrões com os respetivos tempos de retenção e iões característicos.

<b>Analitos</b>	<b>Tempo de Retenção, min</b>	<b>Iões característicos, m/z</b>
<b>Antraceno</b>	13,34	89; 178*
<b>Buprofezina</b>	19,86	105*; 172
<b>Cipermetrina</b>	-	-
<b>Clortalonil</b>	-	-
<b>Clorpirifos</b>	16,63	97*; 314
<b>Deltametrina</b>	-	-
<b>Dimetoato</b>	12,36	87*; 178
<b>Endossulfão-Sulfato</b>	-	-
<b>Antraceno</b>	13,34	89; 178*
<b>Fosfamidão</b>	14,84	127*; 264
<b>Fosmete</b>	23,30	160; 317*
<b>Lambda-Cialotrina</b>	24, 96	181*; 197
<b>Malatão</b>	16,33	125*; 173
<b>Metidatão</b>	18,41	85; 145*
<b>Oxifluorfena</b>	19,91	252*; 361
<b>Paratão-Metil</b>	15,04	109*; 263
<b>Tebuconazol</b>	22,31	70; 125*
<b>Terbutilazina</b>	13,14	173; 214*
<b>Triclorfão</b>	4	79; 109*

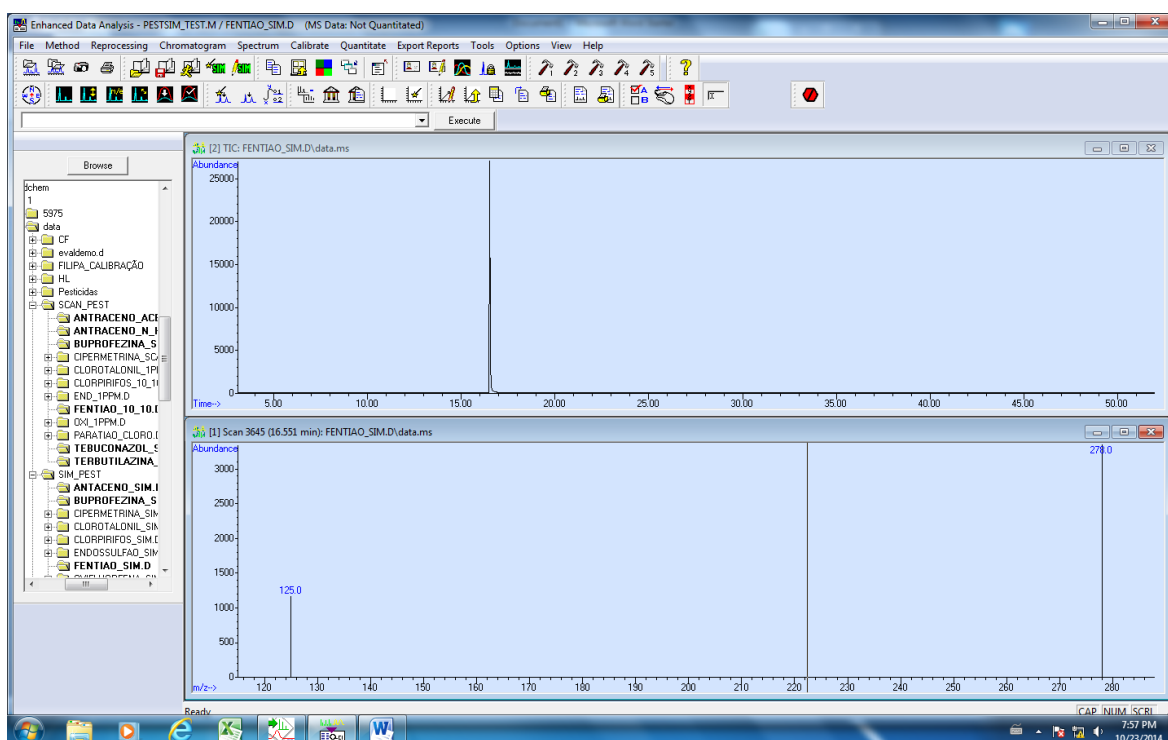
\*ião de quantificação

Houve alguns resíduos de pesticidas para os quais não se conseguiu obter quaisquer resultados, compostos assinalados com um “-” na tabela acima apresentada. Pressupõe-se que este resultado tenha acontecido devido à solubilidade, ou falta dela, por parte do resíduo para com o solvente selecionado e pode-se verificar através da Figura 34.



**Figura 34-** Cromatograma do padrão Clortalonil em SCAN.

Por outro lado, o método SIM, com seleção de iões, mostrou-se mais adequado para a quantificação dos diferentes compostos, devido à maior sensibilidade e seletividade obtida. Deste modo, injetou-se em SIM os compostos cujos resultados em SCAN foram positivos. De seguida, é dado um exemplo de cromatograma do resíduo Fentião em SIM (Figura 35).



**Figura 35-** Cromatograma do Fentião mostrando os iões maioritários selecionados.

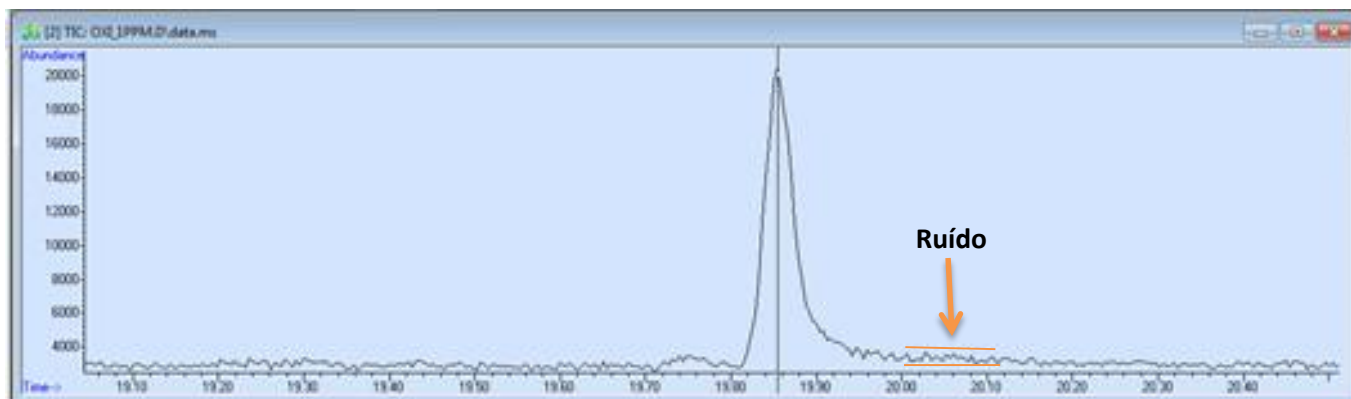
Após as várias injeções dos padrões de pesticidas, em SCAN e SIM, foram determinados os limites de detecção e quantificação dos mesmos para se saber qual o menor valor da concentração do analito que pode ser detetado/quantificado com confiança. Os valores calculados estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6-** Limites de detecção e quantificação para os padrões estudados, em ppb, nos modos SCAN (\*) e SIM (\*\*).

<b>Analitos</b>	<b>LD*</b>	<b>LQ*</b>	<b>LD**</b>	<b>LQ**</b>
<b>Antraceno</b>	50	500	20	300
<b>Buprofezina</b>	33,3	330	6,6	66,6
<b>Clorpirifos</b>	42,5	142,8	1,5	5
<b>Dimetoato</b>	107	1077	2,25	7,5
<b>Fentião</b>	17,3	57,1	4	13,3
<b>Fosfamidão</b>	333	666	20	66,6
<b>Fosmete</b>	115,4	1154	75	500
<b>Lambda-Cialotrina</b>	15	500	750	250
<b>Malatão</b>	120	400	70	300
<b>Metidatão</b>	57	187	6	20
<b>Oxifluorfena</b>	130	450	3	10
<b>Paratão-Metil</b>	66,6	22,2	5	17,4
<b>Tebuconazol</b>	15,21	152,2	6,37	63,7
<b>Terbutilazina</b>	4	133	30	100
<b>Triclorfão</b>	7,5	250	425	124

### Exemplo de cálculo do LD e LQ para o padrão Oxifluorfena

**SCAN:**



**Figura 36-**Cromatograma da Oxifluorfena em SCAN.

**Altura do pico:** 20 000

**Relação Sinal-Ruído:**  $3400-2500= 900$

$20\ 000/900= 22,2$

**Para efeitos de deteção:**

$22,2/3= 7,40$

$1\text{ ppm}/7,40= 0,13\text{ ppm}=130\text{ ppb}$  (**Deteção Mínima**)

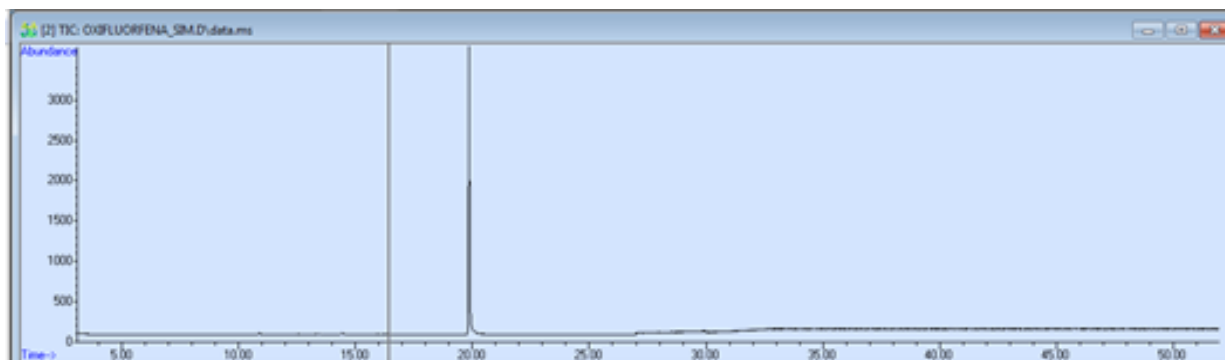
**Para efeitos de quantificação:**

$22,2/10=2,22$

$1\text{ ppm}/2,22= 0,45\text{ ppm}= 450\text{ ppb}$  (**Quantificação Mínima**)

Portanto, através deste cromatograma da oxifluorfena em SCAN comprova-se que é possível detetá-la até aos 130 ppb, no entanto só é viável quantificá-la até aos 450 ppb.

**SIM:**



**Figura 37-**Cromatograma da Oxifluorfen em SIM.

**Altura do pico:** 3 800

**Relação Sinal-Ruído:** 98-94=4

$$3\,800/4 = 950$$

**Para efeitos de detecção:**

$$950/3 = 316,6$$

$$1\text{ ppm} / 316,6 = 0,003\text{ ppm} = 3\text{ ppb} \text{ (Deteção Mínima)}$$

**Para efeitos de quantificação:**

$$950/10 = 95$$

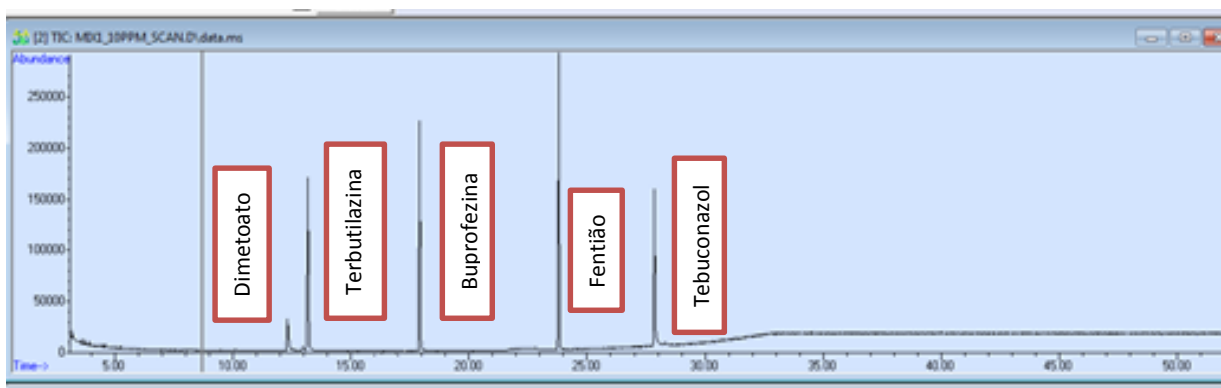
$$1\text{ ppm} / 95 = 0,01\text{ ppm} = 10\text{ ppb} \text{ (Quantificação Mínima)}$$

Portanto, através deste cromatograma da oxifluorfen em SIM comprova-se que é possível detetá-la até aos 3 ppb, no entanto só é viável quantificá-la até 10 ppb.

### 6.1.2. Resultados Cromatográficos-MIX 1 de padrões

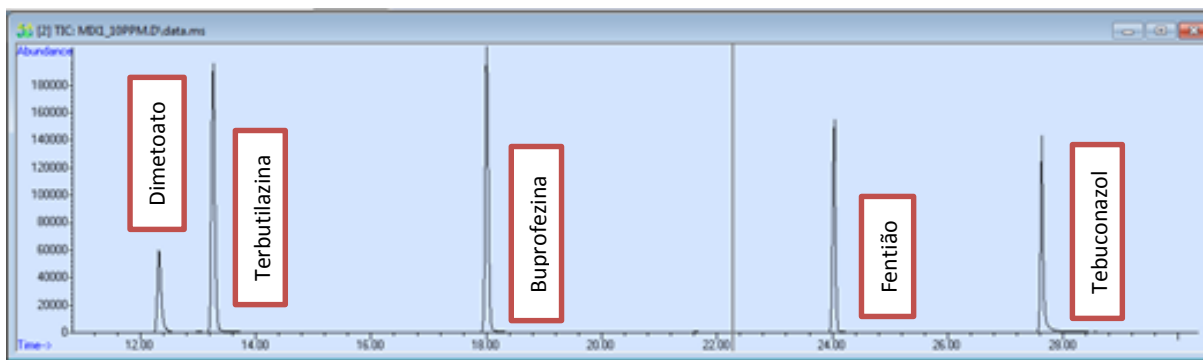
Tendo obtido bons resultados cromatográficos, tanto em SIM como em SCAN dos resíduos: Dimetoato, Terbutilazina, Buprofezina, Fentião e Tebuconazol; conhecendo os seus tempos de retenção, iões maioritários e classe química dos mesmos, optou-se por construir um Mix 1 com estes compostos. O Mix 1 foi elaborado como mostra a Figura 19, representada no capítulo anterior.

De seguida apresentam-se as figuras com os resultados cromatográficos do Mix 1 para a concentração de 10 ppm. A Figura 38 apresenta uma cromatografia límpida, sem contaminações, com pouco ruído e pouco *bleeding*.



**Figura 38-** Cromatograma do Mix 1 com uma concentração de 10 ppm, em SCAN.

Na Figura 39, pode-se observar o cromatograma em SIM, onde se verifica uma maior sensibilidade do aparelho perante os picos selecionados, obtendo assim resultados mais fidedignos.

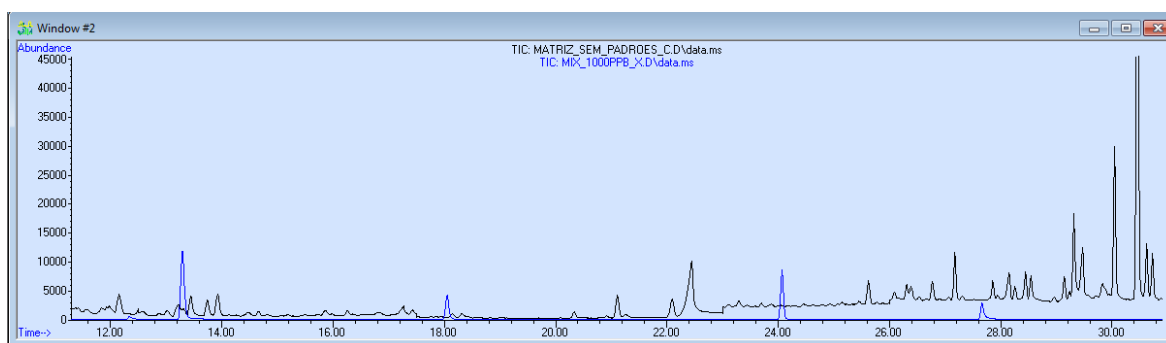


**Figura 39-** Cromatograma do Mix 1 com uma concentração de 10 ppm, em SIM.

### 6.1.3. Relação entre a matriz e o Mix de padrões

Sempre que se queiram interar padrões com uma matriz, é importante conhecer-se, individualmente, ambas as partes. Realiza-se então esta ação, inicialmente com o objetivo

de conhecer o seu aspeto, mas depois também para perceber como se comportam e interagem entre eles. Por esta mesma razão é que se faz um Quechers, isento de padrões, verificando assim a sua interferência na posterior análise de resíduos, como referi no capítulo anterior. Por este motivo, sobrepõem-se os dois cromatogramas, o da matriz isenta de padrões e o do Mix, como se pode observar na seguinte figura, para verificar se existem alguns iões da matriz que interfiram com os compostos escolhidos.



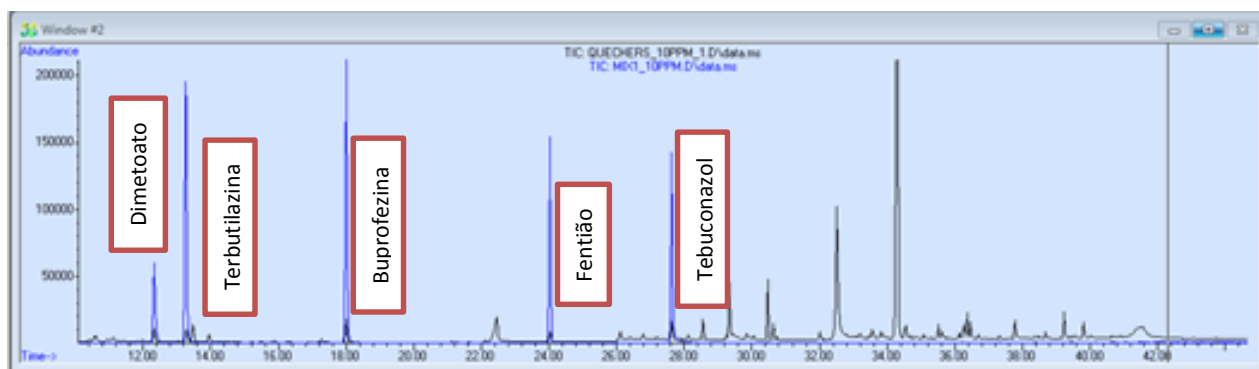
**Figura 40-** Overlay do cromatograma do Mix 1 (10 ppm) com a matriz isenta de padrões, em SIM.

Na mesma linha de orientação, e de modo a verificar até que concentrações os resultados do aparelho seriam viáveis, fizeram-se várias injeções das várias concentrações do Mix 1 em SCAN e SIM.

Estando o aparelho com uma boa sensibilidade e reprodutibilidade relativamente ao Mix1, pode-se então passar para a análise destes padrões na matriz de azeite escolhida anteriormente.

#### 6.1.4. Resultados Cromatográficos-Quechers com MIX 1

A seguinte figura demonstra a sobreposição de cromatogramas do Mix 1 com concentração de 10 ppm, com o Quechers onde foi adicionado 1ml do Mix 1 com a mesma concentração.



**Figura 41-** Overlay dos cromatogramas do Mix 1 de 10 ppm com o Quechers.

Após as seguintes injeções do Mix 1, com e sem a matriz, foi possível concluir que não foi possível partir para a calibração deste devido às baixas recuperações obtidas dos padrões deste Mix. Após a observação dos cromatogramas obtidos para o Quechers com o Mix1 foi possível, através da ferramenta de trabalho *Integrate and Label Peak Areas*, fazer a integração dos picos e construir a reta de calibração para o composto Dimetoato.

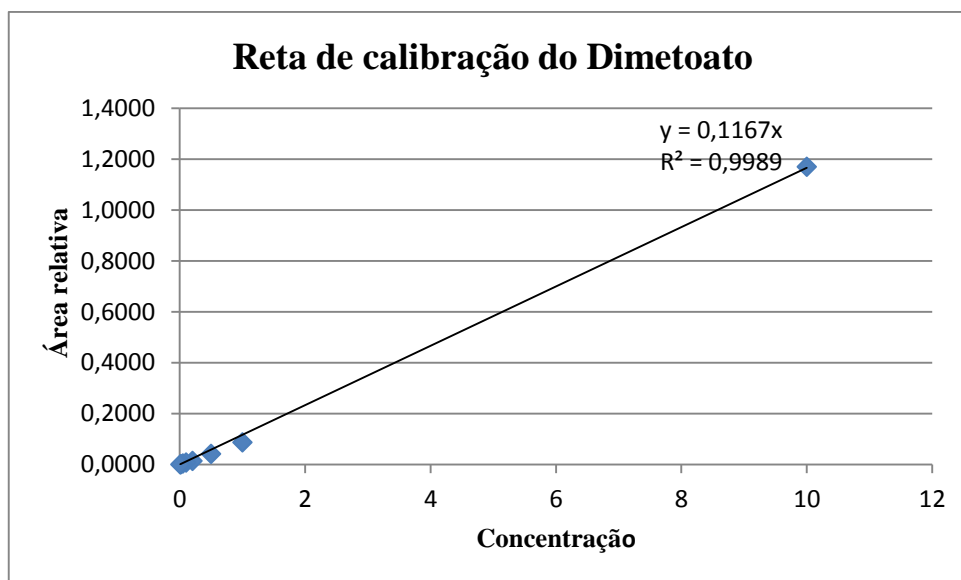
**Tabela 7-** Cálculo da área relativa.

Pesticida	Concentração Pesticida, ppm	Área Pesticida	Área PI	Área Relativa
Dimetoato	10	68989	58936	1.1706
	1	5149	59090	0.0871
	0.5	2404	57007	0.0422
	0.2	881	63789	0.0138
	0.1	465	59712	0.0078
	0.05	275	61958	0.0044
	0.02	99	57936	0.0017
	0.01	0	53277	0

$$\text{Área relativa} = \frac{\text{Área de pesticida}}{\text{Área padrão interno}}$$

Na seguinte figura está representada a reta de calibração do Dimetoato, que está presente no Mix1.





**Figura 42-** Reta de calibração do Dimetoato.

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados obtidos da concentração relativa no extrato, obtidos através da equação da reta de calibração do Dimetoato para as diferentes concentrações e as respectivas recuperações, calculadas através da fórmula descrita anteriormente no ponto 5.6..

**Tabela 8-** Cálculo da concentração relativa e respetivo fator de recuperação.

Concentrações do Dimetoato, ppm	Concentração relativa	Fator de Recuperação, %
10	10.03063	100.306
1	0.746686	74.669
0.5	0.361356	72.271
0.2	0.118348	59.174
0.1	0.06673	66.730
0.05	0.038033	76.067
0.02	0.014643	73.213
0.01	0	0.000

Constata-se então que para este padrão, obtiveram-se baixas percentagens de recuperação, como se pode verificar pela tabela anterior. Os resultados de recuperação obtidos variam de 59 a 100%, com um coeficiente de variação de 41%, valores estes que se encontram fora do intervalo estabelecido pelo Eurachem Guide.

Para a construção das retas dos restantes padrões do Mix 1, efetuou-se o mesmo procedimento, obtendo-se as seguintes retas de calibração e os respetivos fatores de recuperação, como se pode constatar na tabela seguinte.

**Tabela 9-** Retas de calibração dos restantes padrões do mix1 e o fator de recuperação obtido.

Mix1	Reta de calibração	Coefficiente de correlação	Fator de recuperação, %	Coefficiente de variação, %
Terbutilazina	$Y=0.1261x$	0.9989	28 a 100	72
Buprofezina	$Y=0.1298x$	0.9968	30 a 97	67
Fentião	$Y=0.123x$	0.9992	51 a 100	49
Tebuconazol	$Y=0.118x$	0.9989	33 a 100	67

Pode-se concluir que não foi possível partir para a calibração do Mix 1 devido à pouca percentagem de recuperação obtida. Do mesmo modo, também não foi possível obter a calibração do Mix 2 devido exatamente ao mesmo problema. No entanto, na fase terminal do trabalho conseguiu-se fazer ainda alguns testes de modo a otimizar o procedimento do método, tentando alcançar melhores resultados de extração. De todos os testes que se fizeram, como: adicionar maior quantidade de solvente de extração, maior quantidade de sais ou maior quantidade de PSA, bastou apenas o aumento do tempo de agitação e de centrifugação, mantendo exatamente o mesmo procedimento, para que se obtivessem maiores percentagens de recuperação.

Após a concretização dos testes referidos anteriormente, sugere-se para trabalho futuro a realização do método de Quechers otimizado, isto é, agitar 2 minutos na etapa de partição, 1 minuto na etapa de *clean-up*, e 8 minutos de centrifugação em ambas as partes, ao invés de 1 minuto, 30 segundos e 5 minutos respetivamente.

## 6.2. Análise de pesticidas – Complemento do método utilizado na empresa

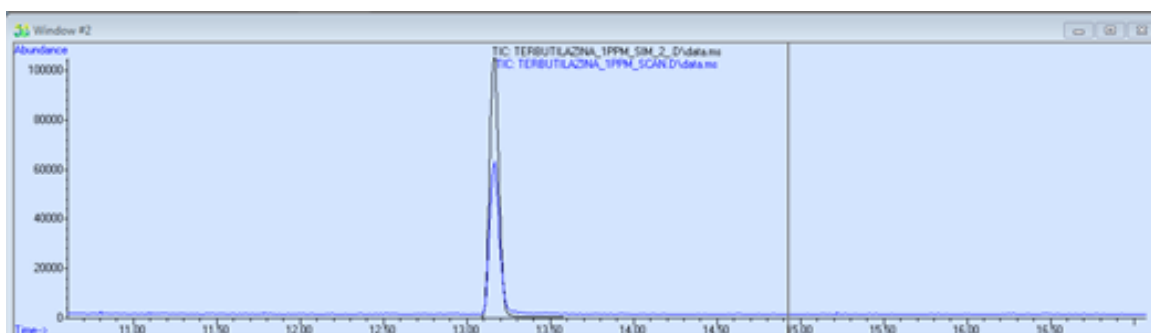
De seguida, apresentam-se os resultados obtidos para os resíduos malatião, clorpirifos, oxifluorfena, cipermetrina e deltametrina, utilizando agora o método já implementado na empresa, adicionando-lhe um novo padrão, a terbutilazina.

Na Tabela 10 podem verificar-se os tempos de retenção dos compostos analisados por esse método.

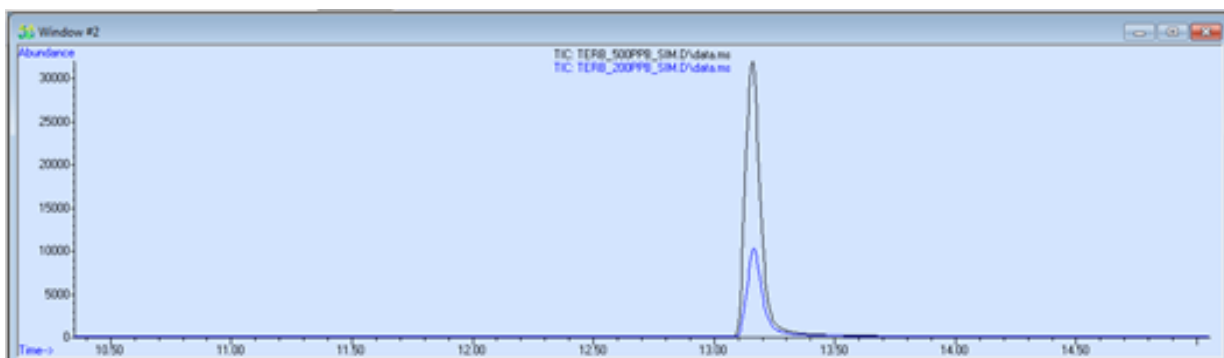
**Tabela 10-** Padrões de pesticidas com os respectivos tempos de retenção e iões característicos.

Nome	Tempo de Retenção, minutos	Iões Quantificação	Iões Qualificação
<b>Malatião</b>	16,48	125	173
<b>Clorpirifos</b>	16,78	197	314
<b>Oxifluorfena</b>	20,03	252	361
<b>Endossulfão-sulfato (Padrão Interno)</b>	21,88	272	387
<b>Cipermetrina</b>	28,08	181	163
<b>Deltametrina</b>	30,54	181	251

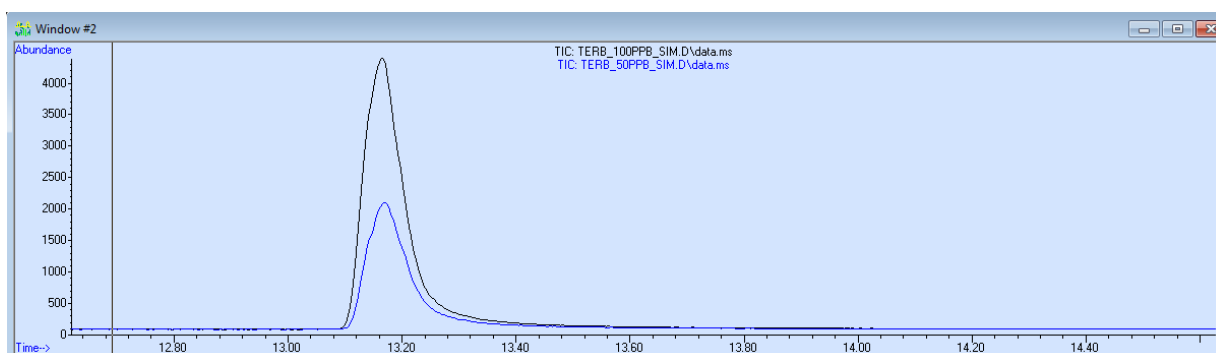
Efetuaram-se injeções individuais da terbutilazina, em SCAN e em SIM, para as diversas concentrações, como se pode observar pelas figuras seguintes.



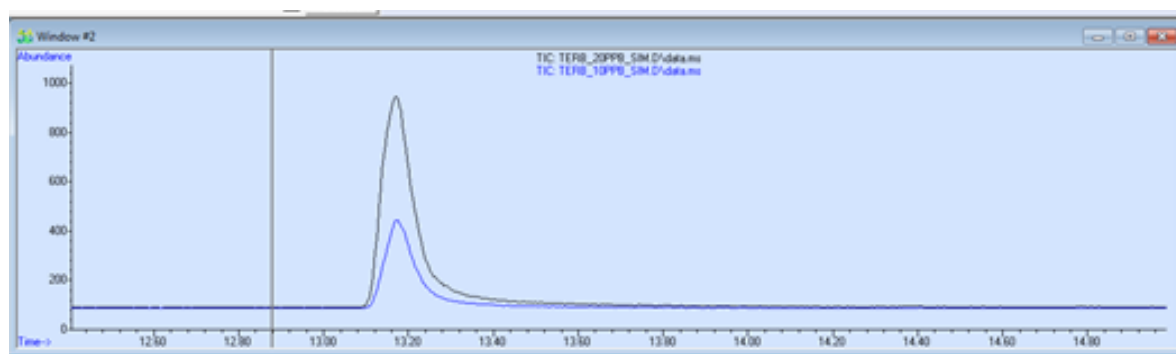
**Figura 43-** Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 1 ppm em SCAN e SIM.



**Figura 44-** Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 500ppb e 200ppb, em SIM.



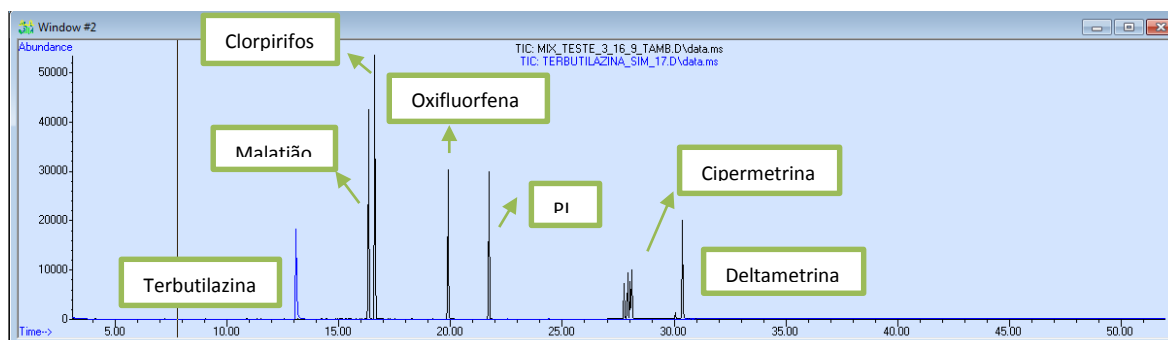
**Figura 45-** Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 100 ppb e 50ppb, em SIM.



**Figura 46-** Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com 20ppb e 10ppb, em SIM.

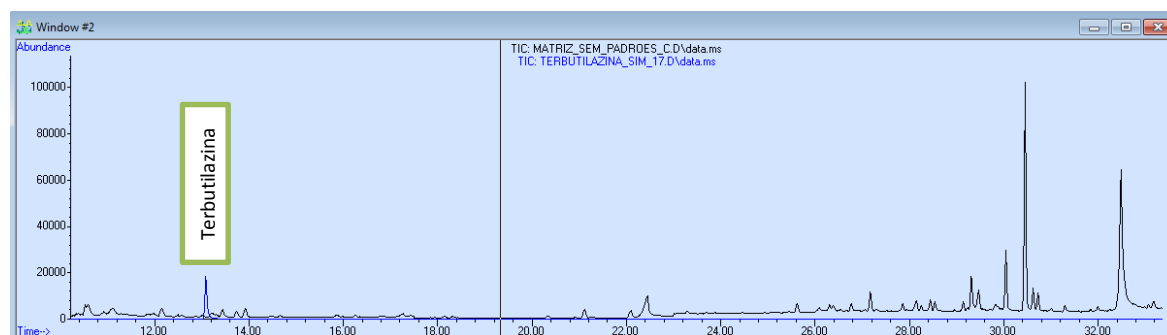
Como se pode constatar através das figuras anteriores, este composto apresenta, para os métodos cromatográficos utilizados, um tempo de retenção de 13,15 minutos. Ao comparar este tempo com a Figura 47 pode comprovar-se que este não se sobrepõe a

nenhum dos compostos analisados atualmente por este método, sendo deste modo possível a sua introdução nesta corrida.



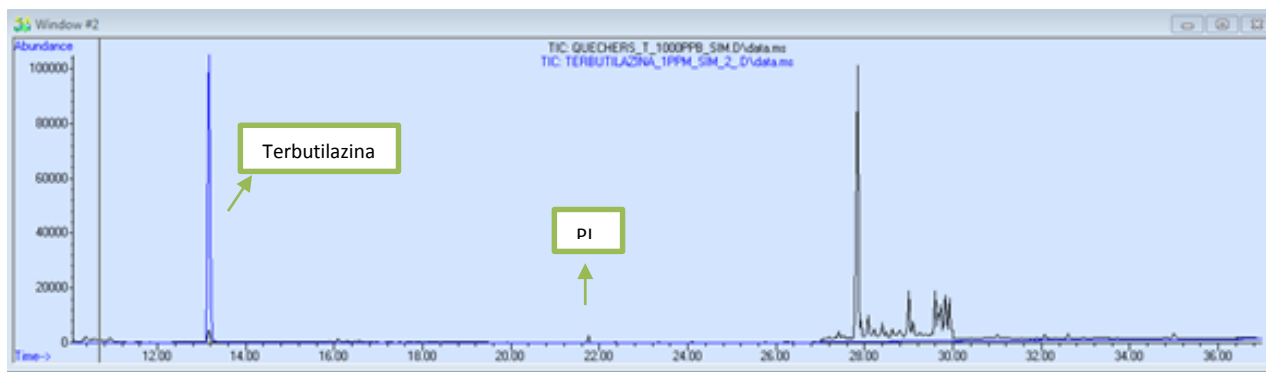
**Figura 47-** Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com os padrões já implementados.

Outro ponto importante é, como se referiu anteriormente, a relação entre o padrão de pesticida analisado e a interferência que a matriz, o azeite, pode ter com o mesmo. Fez-se um *overlay* da terbutilazina com a matriz, também em SIM de modo a verificar se no tempo de retenção deste composto não existe nenhum ião presente na matriz que possa interferir com o mesmo.



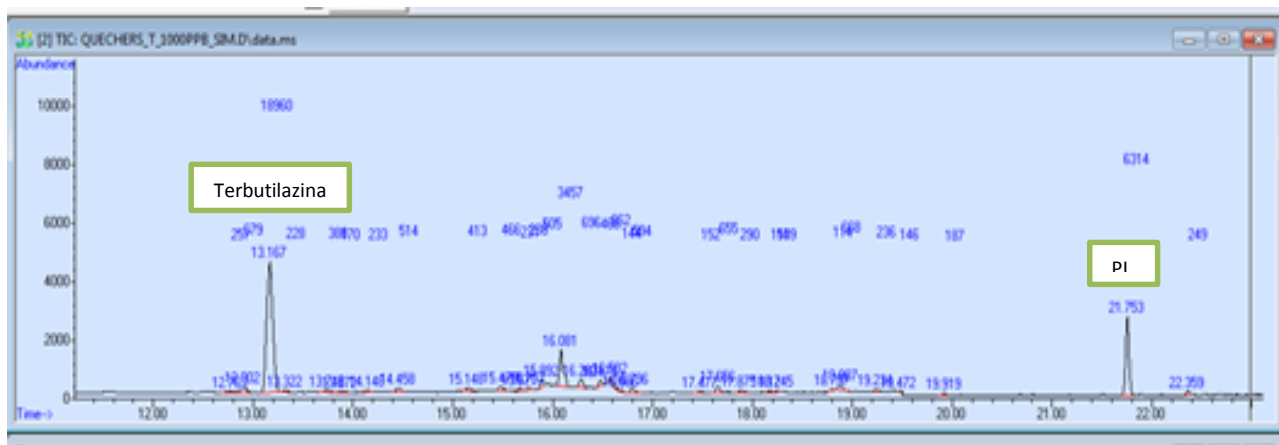
**Figura 48-** Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com o Quechers isento de padrões, em SIM.

Constatando-se que não há nenhum ião na matriz que possa causar interferência com o pico do padrão no tempo de retenção desejado, passou-se para a etapa seguinte, como se verifica pela figura seguinte.



**Figura 49-** Overlay dos cromatogramas da Terbutilazina com o Quechers, em SIM.

A etapa seguinte consistiu na elaboração do procedimento do método de Quechers, adicionando-lhe 1ml do padrão de terbutilazina nas diferentes concentrações escolhidas (10 ppm, 1 ppm, 500 ppb, 200 ppb, 100 ppb, 50 ppb, 20 ppb e 10 ppb). Após a extração, injetou-se réplicas das amostras (três injeções de cada), de modo a garantir a reprodutibilidade do aparelho e, ao mesmo tempo, dando a hipótese de excluir algum cromatograma no caso de este causar um desvio dos pontos da reta que se pretende depois construir. Estas injeções são feitas da amostra menos concentrada, para a mais concentrada, de modo a evitar contaminações e falhas nos resultados. Após a obtenção dos cromatogramas referentes às injeções necessárias para a construção da reta de calibração, partiu-se para a análise dos dados (Figura 50) e consequentemente para a obtenção da mesma.



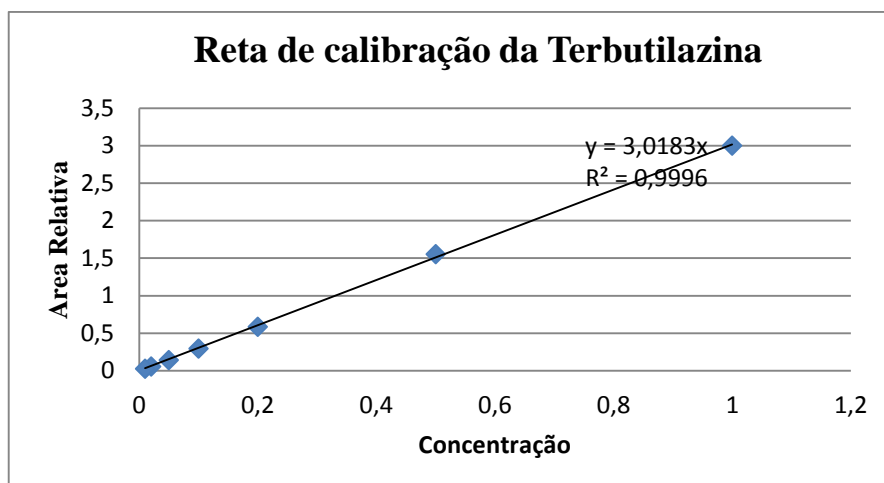
**Figura 50-** Representação cromatográfica da integração da Terbutilazina (1 ppm) e do padrão interno.

Na tabela seguinte apresentam-se as concentrações das diferentes diluições da terbutilazina e as áreas dos mesmos obtidos após extração, fazendo a integração dos cromatogramas. A área do padrão interno, será aproximadamente igual, pois adicionou-se sempre a mesma quantidade com uma concentração de 10 ppm.

**Tabela 11-** Áreas obtidas na integração dos cromatogramas adquiridos na extração do Quechers.

Concentração Pesticida, ppm	Área Pesticida	Área Padrão Interno	Área relativa
<b>1</b>	18960	6314	3.003
<b>0.5</b>	9818	6326	1.552
<b>0.2</b>	3834	6581	0.583
<b>0.1</b>	1972	6781	0.291
<b>0.05</b>	988	7047	0.140
<b>0.02</b>	362	6602	0.055
<b>0.01</b>	133	5762	0.023

Após a análise dos dados dos cromatogramas foi então possível construir a reta de calibração para a terbutilazina, como mostra a Figura 51.



**Figura 51-** Reta de calibração obtida para a terbutilazina.

A reta obtida apresenta uma boa linearidade na faixa de concentração estudada, com um coeficiente de correlação superior a 0,99, portanto não existirá uma quebra da linha, pois não existem pontos desviados na reta. A região perto do ponto (0,0) é uma região cinzenta, pois aqui poderão existir alguns erros associados a estas concentrações tão baixas, pois está-se a trabalhar perto do limite de quantificação e de detecção e o ruído do aparelho pode influenciar a reta, sendo difícil ter precisão com essas oscilações.

Na Tabela 12 apresentam-se os resultados obtidos da concentração relativa no extrato, obtidos através da equação da reta da terbutilazina para as diferentes concentrações e os respetivos fatores de recuperação obtidos.

**Tabela 12-** Cálculo da Concentração relativa e da recuperação para as diversas concentrações.

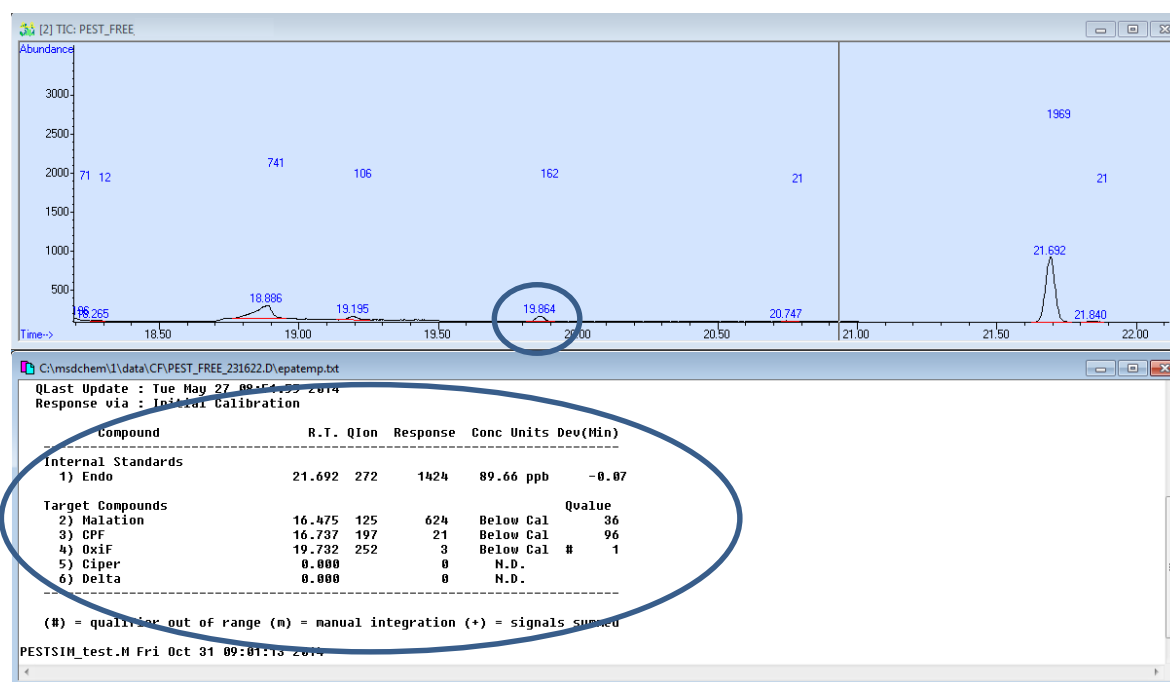
Concentração Pesticida, ppm	Área relativa	Concentração relativa	Fator de recuperação, %
<b>1</b>	3.003	0.995	99,5
<b>0.5</b>	1.552	0.514	102,8
<b>0.2</b>	0.583	0.193	96,5
<b>0.1</b>	0.291	0.096	96
<b>0.05</b>	0.140	0.046	92
<b>0.02</b>	0.055	0.018	90
<b>0.01</b>	0.023	0.008	80



Os resultados de recuperação obtidos para o composto em estudo, variam de 80 a 103%, com um coeficiente de variação de 23%, valores esses que se encontram dentro do intervalo estabelecido pelo *Eurachem Guide*. Depois da obtenção dos dados, colocam-se os mesmos no *software GC-MSD Data Analysis*, e posteriormente inicia-se uma fase de testes de modo a verificar a veracidade do método, isto é, compara-se os resultados obtidos num laboratório externo com os resultados obtidos na empresa.

### 6.3. Análise de resíduos de pesticidas – Controlo de fornecedores

De seguida, apresenta-se um pequeno exemplo de uma análise efetuada no laboratório de físico-química da Victor Guedes, à qual os resultados obtidos através do cálculo automático do programa utilizado não correspondiam ao que na verdade nos era apresentado no cromatograma obtido.



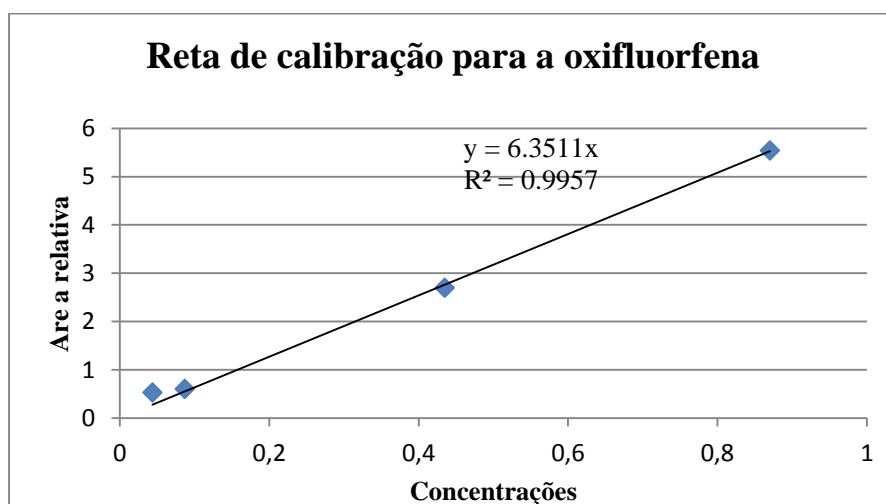
**Figura 52-** Método implementado na empresa.

Como é possível verificar através do cromatograma obtido, esta amostra de azeite contém um dos pesticidas com mais incidência no azeite, a oxifluorfená. Depois de ser aplicada a função do *Calc Quant Report* para calcular a concentração com que os

pesticidas aparecem nesta amostra é possível verificar que a Oxifluorfena não é quantificada, no entanto ela aparece no cromatograma. Portanto, a partir dos dados obtidos na calibração antiga foi possível construir a reta de calibração (Figura 53) obtida para o método já existente e desta maneira quantificar o pesticida.

**Tabela 13-** Cálculo da área relativa.

Concentrações, ppm	Área Oxifluorfena	Área Padrão Interno	Área Relativa
<b>0.87</b>	13277	2396	5.5413189
<b>0.435</b>	7468	2770	2.6960289
<b>0.087</b>	1935	3223	0.6003723
<b>0.0435</b>	1850	3485	0.5308465



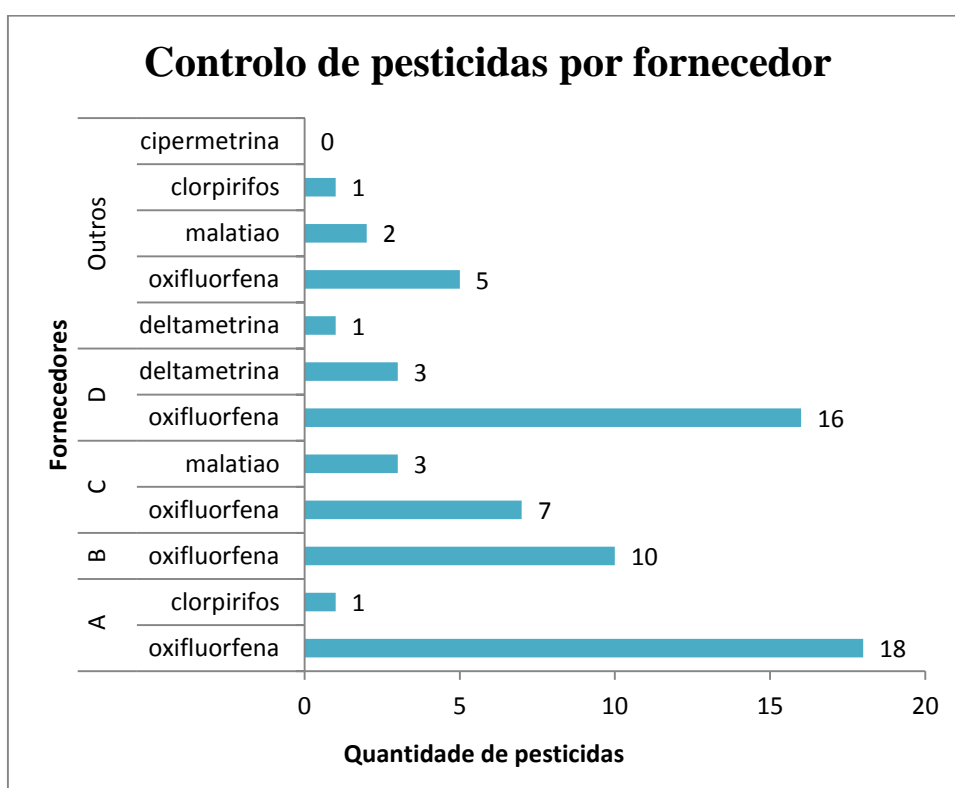
**Figura 53-** Reta de calibração para a Oxifluorfena.

Na Figura 52, mencionada atrás, é possível verificar, após integração que a oxifluorfena apresenta uma área de 162 e o Padrão Interno, que neste método já implementado é o Endossulfão, apresenta 1969 de área. Desde já é possível calcular a área relativa da oxifluorfena, que é 0,08 através de uma fórmula mencionada anteriormente. Agora, através da reta de calibração é possível calcular a concentração real do pesticida na matriz, que neste caso foi de 0.01 ppm. Deste modo, é possível concluir que o método já implementado poderá apresentar algum *bug*.

Esta amostra foi também analisada, em termos de resíduos de pesticidas, num laboratório externo, vindo a confirmar-se que a oxifluorfena era realmente detetada nesta amostra, sendo o seu valor, tanto na empresa como no laboratório externo, de 0,01 ppm.

Apresenta-se de seguida, a título de exemplo, alguns resultados sobre a incidência de resíduos de pesticidas nos fornecedores sob os quais se efetuou esta análise, com o método descrito no subcapítulo 6.2..

Na Figura 54, pode-se constatar quais os resíduos de pesticida mais detetados no azeite.



**Figura 54-** Principais incidências de pesticidas na VG.

Pode-se então verificar que, nos azeites do fornecedor A, em 30 análises efetuadas aos mesmos, detetou-se dezoito vezes oxifluorfena e uma vez clorpirifos. Para o fornecedor B, em vinte e seis análises realizadas, detetaram-se dez vezes oxifluorfena. No que diz respeito ao fornecedor C, foram encontrados oxifluorfena e malatiao, sete e três vezes, respetivamente. Quanto ao fornecedor D, ao qual se efetuaram vinte e nove

análises, dezasseis dessas acusaram oxifluorfena e três, deltametrina. Para além destas, efetuaram-se também mais setenta análises a outros fornecedores, onde a oxifluorfena voltou a ter uma maior incidência. No entanto, em todas as análises efectuadas, estes pesticidas encontravam-se dentro dos limites legais impostos pela União Europeia. Quando se ultrapassam os limites legalmente permitidos, as entradas de azeite são rejeitadas e devolvidas ao fornecedor.

Os resultados obtidos com este pequeno estudo já eram de esperar, visto que a oxifluorfena é um composto existente em agentes que visam a eliminação de ervas infestantes presentes nos olivais.

## Capítulo 7- Considerações Finais

Umas das principais conclusões que posso retirar de todas as análises que fiz foi que, o solvente inicialmente escolhido para fazer as soluções padrão não foi o melhor, fazendo-se, posteriormente alguns testes com clorofórmio, n-hexano e ciclohexano, dependendo da solubilidade dos pesticidas com estes. Assim sendo, escolheu-se o clorofórmio para preparação das soluções mãe, no entanto, as diluições são feitas em n-hexano, pois este é um solvente que apresenta um ponto de ebulição próximo do clorofórmio. Inicialmente tentou-se dissolver o conteúdo do resíduo em acetonitrilo e depois perfazer o balão com n-hexano, no entanto, constatou-se que estes dois solventes eram imiscíveis.

Foi possível concluir que, após a realização do método de Quechers, para extrair analitos de interesse da matriz com baixas concentrações, obtiveram-se baixas percentagens de recuperação, tentando-se depois otimizar o método com o aumento do tempo de agitação e de centrifugação nas etapas de partição e *clean-up*. Portanto, para que um método analítico conduza a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida é necessário que os laboratórios disponham de critérios que permitam garantir a fiabilidade dos resultados. Neste trabalho foram avaliadas as percentagens de recuperação obtidas, bem como a precisão, reprodutibilidade, limites de deteção e quantificação, entre outras.

Este estágio foi deveras importante para mim, pois contribuiu de forma muito positiva para a minha formação, permitindo-me adquirir conhecimentos de algumas técnicas analíticas e trabalhando com profissionais especializados na área. Pude também, alargar os meus conhecimentos, não apenas na minha área de formação, mas também noutras áreas que até então desconhecia.



## Referências Bibliográficas

- Araújo, D.S., “Análise dos Resultados dos planos de controlo de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal: Anos 2007-2009”, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- Aires, C.M.G.L.S., “Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da Indústria de extração de azeite em solos agrícolas”, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2007.
- Cunha, S.C.S.,” Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas: Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas”. Universidade do Porto, Porto, 2007.
- Barbosa, S.C.B., “Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD”, Universidade de Lisboa, 2012.
- Cabrera, L.C., *et al.*, “Extração em Fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos”, *Scientia Chromatographica*; vol. 4, nº3, pág. 227-240, 2012.
- Chiaradia, M.C., “Desenvolvimento, Validação e Aplicação de métodos para análise multiresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD”, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2009.
- Coulson, J. e Richardson, J., “*Tecnologia Química.*”, Volume III, Fundação Calouste Gulbenkein, Lisboa, 1985.
- Eurachem, “Métodos analíticos adecuados a su propósito”, Guia de laboratório para la validación de métodos y temas relacionados, 2ª edição, México, 2005.
- Lopes, J.P.P.S.,” Polinização em oliveira cvs. Galega e Cobrançosa: avaliação do vingamento em ensaios de polinização controlada e do efeito da aplicação de Um bioestimulante”, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2011.

Oliveira, F.A.S., “Validação de um Método Multiresíduo e Multiclasses para Determinação e Quantificação de 140 Resíduos de Agrotóxicos em Leite através da Técnica LC-MS/MS”, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Oliveira, L.A.G., “Determinação de Resíduos de Agrotóxicos Organoclorados em Laranja por Dispersão de Matriz em Fase Sólida (MSPD)”, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.

Pedrosa, S.S.S., “Análise dos componentes do Azeite utilizando Métodos Quimiométricos”, Universidade de Aveiro, 2010.

Pereira, I.M., “Análise de pesticidas na polpa e casca de frutas para sumo”, Universidade de Aveiro, 2009.

Prestes, O.D., *et al.*, “QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas”, *Quim. Nova*, Vol.32, nº 6, pág. 1620-1634, 2009.

OJE, “Portugal atinge autossuficiência em azeite”, nº 1631, pág.1, Abril de 2014.

Sampaio, M.R.F., “Otimização e validação de métodos empregando Quechers modificado, LC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em derivados da cana-do-açúcar”, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2011.

Santos, G.M.M., “Análise de mercado de exportação de azeite português”, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2011.

Silva, R.L., “Desenvolvimento de Método para a Determinação de Resíduos de Pesticidas em Alface (*Lactuca sativa* L.) Produzida em Sistema Convencional”, Universidade Federal de Sergipe, Brasil, 2010.



## Webgrafia

ADEMO, Associação para o Desenvolvimento dos Municípios Olivícolas Portugueses. Disponível em: [http://www.ademo.pt/index.php?option=com\\_frontpage&Itemid=1](http://www.ademo.pt/index.php?option=com_frontpage&Itemid=1) (Consultado a 27 de Abril de 2014)

A companhia do Azeite, A qualidade do azeite. Disponível em: <http://www.companhiadoazeite.com.br/?p=777> (Consultado a 29 de Abril de 2014)

Biomedicina Brasil, Métodos Cromatográficos. Disponível em: <http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html> (Consultado a 29 de Outubro de 2014)

CAP, Informação do setor do Azeite. Disponível em: [file:///C:/Users/Cati/Downloads/info%20azeite%20maro%202014%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Cati/Downloads/info%20azeite%20maro%202014%20(2).pdf)  
<file:///C:/Users/Cati/Downloads/info%20azeite%20junho%202014.pdf> (Consultado a 26 Maio de 2014)

Casa do azeite. Disponível em: <http://www.casadoazeite.pt/Profissionais/Casa-do-Azeite> (Consultado a 28 de Abril de 2014)

COI, International Olive Council. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org> (Consultado a 25 de Maio de 2014)

CONFRAGI, Produção de azeite em 2013 bateu o recorde dos últimos 50 anos. Disponível em: <http://www.confagri.pt/Noticias/Pages/noticia49634.aspx> (Consultado a 26 Maio de 2014)

Eurostat, Agricultural statistics. Disponível em: [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY\\_OFFPUB/KS-ED-08-001/EN/KS-ED-08-001-EN.PDF](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-ED-08-001/EN/KS-ED-08-001-EN.PDF) (Consultado a 28 de Março de 2014)

Gallo. Disponível em: <http://www.gallooliveoil.com/pt/sobre-nos.aspx> (Consultado a 26 de Abril de 2014)

INE, Estatísticas dos Indicadores Agro-Ambientais. Disponível em: [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0004077&contexto=bd&selTab=tab2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0004077&contexto=bd&selTab=tab2) (Consultado a 27 de Março de 2014)

Infoescola, Oliveira. Disponível em: <http://www.infoescola.com/plantas/oliveira/> (Consultado a 27 de Abril de 2014)

Vilarinho, F., Pesticidas . Disponível em: <http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/772/1/Pesticidas%202011.pdf> (Consultado a 28 de Março de 2014)